

REBECCA SILVEIRA SANTOS BARBOSA DANTAS

**IMPORTÂNCIA DO GENE *WEE1* E EFEITOS DA SUA INIBIÇÃO NA
SOBREVIDA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS DO MIELOMA MÚLTIPLO**

Dissertação apresentada à
Escola Paulista de Medicina –
Universidade Federal de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

**SÃO PAULO
2019**

REBECCA SILVEIRA SANTOS BARBOSA DANTAS

**IMPORTÂNCIA DO GENE *WEE1* E EFEITOS DA SUA INIBIÇÃO NA
SOBREVIDA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS DO MIELOMA MÚLTIPLO**

Dissertação apresentada à
Escola Paulista de Medicina –
Universidade Federal de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gisele Wally Braga Colleoni

SÃO PAULO

2019

Barbosa-Dantas, Rebecca Silveira Santos

Importância do gene *WEE1* e efeitos da sua inibição na sobrevida de células-tronco tumorais do mieloma múltiplo. Rebecca Silveira Santos Barbosa Dantas, São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação.

Importance of the gene *WEE1* and effects of its inhibition in the survival of multiple myeloma cancer stem cells.

1. Mieloma múltiplo, 2. Células-tronco tumorais, 3. *WEE1*, 4. MK-1775.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
Escola Paulista de Medicina
Departamento de Oncologia Clínica e Experimental

Chefe do Departamento: Prof^a. Dr^a. Maria Stella Figueiredo

Coordenador do curso de Pós-Graduação: Prof^a. Dr^a. Gisele W. B. Colleoni

REBECCA SILVEIRA SANTOS BARBOSA DANTAS

**IMPORTÂNCIA DO GENE *WEE1* E EFEITOS DA SUA INIBIÇÃO NA
SOBREVIDA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS DO MIELOMA MÚLTIPLO**

Banca Examinadora

Titulares:

1. Prof. Dr. Angelo Maiolino - UFRJ
2. Profa. Dra. Fabíola Traina – USP/Ribeirão Preto
3. Profa. Dra. Gisele Zenker Justus – UNIFESP, Campus Diadema

Suplente:

1. Profa. Dra. Mariana Lazarini- UNIFESP, Campus Diadema

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais e irmãos pelo amor, carinho e apoio sempre e ao meu amado marido Danilo pela compreensão e carinho.

Este projeto foi desenvolvido com suporte financeiro da FAPESP (Projeto Temático 2010/17668-6 e 2017/21801-2) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Gisele Colleoni, por acreditar em mim, por dividir suas experiências e abrir os meus olhos para o universo da pesquisa. Agradeço por seu exemplo de profissional dedicada.

Ao Prof. Dr. Alex Sandes pela colaboração e auxílio nos experimentos de citometria de fluxo. Agradeço por sua revisão das minhas análises e por todas as sugestões e críticas.

À Dra. Mariana Bleker de Oliveira, à Dra. Veruska Fook Alves, ao Dr. Rodrigo Fernando Carlini e à Dra. Érica Levatti pelo auxílio na execução dos experimentos, pelos esclarecimentos de dúvidas e apoio.

Agradeço aos técnicos Yumi Maekaua, Miriam Barbosa, Fábio Pinotti Guirao e Daniela Teixeira pela disponibilidade, por ajudar na execução e interpretação de resultados e por estarem sempre disponíveis para esclarecimentos de dúvidas.

A todos os funcionários do Departamento de Oncologia Clínica e Experimental da Universidade Federal de São Paulo e a todas as pessoas que colaboraram para a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus pais, irmãos e marido pelo apoio, compreensão e carinho, vocês são a base e força da minha vida.

E agradeço principalmente a Deus que me sustenta, pois sem Ele não sou nada.

*Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o
Senhor, e não para os homens. Colossenses 3:23.*

RESUMO

Introdução: O mieloma múltiplo (MM) é caracterizado pela infiltração de plasmócitos tumorais na medula óssea (MO), síntese e secreção de imunoglobulinas monoclonais e dano tecidual. A presença de células-tronco tumorais (CSCs) é apontada como a causa predominante na resistência à terapia e recidivas em câncer, sendo assunto ainda pouco explorado no MM. Em estudos anteriores do nosso grupo, as células-tronco tumorais do MM (MM-CSCs) foram isoladas com base na expressão dos marcadores CD138, CD34, CD19 e ALDH1. Após a análise da expressão de genes de *stemness* por PCR *array*, 82% dos genes apresentaram expressão diferencial entre MM-CSCs e plasmócitos tumorais em amostras de pacientes. Entre eles, o gene *WEE1* que é responsável pelo reparo de DNA na fase G2 do ciclo celular, foi identificado como hiperexpresso em MM-CSCs em relação a plasmócitos tumorais. Assim, nossos resultados sugerem a molécula WEE1 como possível alvo terapêutico que pode ser explorado no MM. **Objetivos:** Identificar a presença de possíveis MM-CSCs em linhagens de MM, avaliar a expressão do gene *WEE1* nessas células e realizar estudos funcionais para verificar o efeito da inibição desse gene na viabilidade celular e seu potencial como alvo-terapêutico. **Material e Métodos:** As linhagens celulares de MM foram submetidas a *sorting* por citometria de fluxo (CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+) para identificar MM-CSCs e à cultura em *soft ágar* para avaliar a formação de microesferas. A expressão de *WEE1* foi avaliada nas linhagens celulares por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Após o tratamento com o inibidor de *WEE1* (MK-1775), com ou sem tratamento prévio com inibidor de proteassoma (bortezomibe), avaliamos a viabilidade celular através do teste funcional Prestoblu, e a indução de apoptose e o ciclo celular por citometria de fluxo. **Resultados:** Identificamos a presença de MM-CSCs (CD138-/CD34+/ALDH1+, sendo o CD19 negativo em quatro linhagens selvagens de MM), e a formação de microesferas em *soft ágar* utilizando RPMI-8226, U266 e SKO-007. Todas as linhagens de MM apresentaram expressão de *WEE1* por qPCR. As linhagens celulares RPMI-8226 e U266 mostraram 50% de redução na viabilidade celular após 24 horas de incubação com MK-1775, nas concentrações de 5µM e 20 µM, respectivamente. A linhagem SKO-007 apresentou dose e tempo dependência.

A terapia combinada com bortezomibe e MK-1775 aboliu a formação de microesferas em *soft ágar* nas linhagens RPMI-8226 (também responsiva ao uso isolado dos dois fármacos) e U266, mas a linhagem SKO-007 foi resistente a todos os fármacos, isoladas e combinadas. O tratamento das linhagens com bortezomibe seguido de MK-1775 (tratamento sequencial) *versus* uso isolado de bortezomibe demonstrou impacto estatisticamente significativo na apoptose total: 88,8% vs 74,1% na RPMI-8222; 92,5% vs 86,6% na U266; e 60,2% vs 30,9% na SKO-007 ($p < 0,05$). **Conclusão:** A combinação sequencial dos fármacos bortezomibe e do inibidor de WEE1, MK-1775, induziu apoptose nas linhagens celulares RPMI-8226, U266 e, principalmente, na SKO-007, de forma mais eficiente do que o uso dos fármacos isolados, evidenciando seu efeito na inibição de proliferação de células tumorais em linhagens celulares de MM e, potencialmente, das MM-CSCs.

Palavras-chave: Mieloma Múltiplo; Células-tronco tumorais; *WEE1*; MK-1775.

ABSTRACT

Introduction: Multiple myeloma (MM) is characterized by the infiltration of tumor plasmacytes into the bone marrow (BM), synthesis and secretion of monoclonal immunoglobulins and tissue damage. The presence of cancer stem cells (CSCs) is indicated as the predominant cause of resistance to therapy and relapses in cancer, being a subject still little explored in MM. In previous studies of our group, MM cancer stem cells (MM-CSCs) were isolated based on the expression of CD138, CD34, CD19 and ALDH1 markers. After analysis of stemness gene expression by PCR array, 82% of the genes showed differential expression between MM-CSCs and tumor plasma cells in patient samples. Among them, the *WEE1* gene, responsible for the repair of DNA in the G2 phase of the cell cycle, was identified as overexpressed in MM-CSCs in relation to tumor plasmacytes. Thus, our results suggest the *WEE1* molecule as a possible therapeutic target to be explored in MM. **Objectives:** To identify the presence of possible MM-CSCs in MM cell lines; to evaluate *WEE1* gene expression in these cells; and to perform functional studies to verify the effect of the inhibition of this gene on cell viability and its potential as therapeutic target. **Materials and methods:** MM cell lines were submitted to sorting by flow cytometry to identify MM-CSCs (CD138- / CD19 + / CD34 + / ALDH1 +) and soft agar culture to evaluate the formation of microspheres. *WEE1* expression was evaluated in the cell lines by quantitative real-time PCR (qPCR). After treatment with the *WEE1* inhibitor (MK-1775), with or without proteasome inhibitor (bortezomib) pretreatment, we assessed cell viability through Prestoblue functional test, and the induction of apoptosis and the cell cycle by flow cytometry. **Results:** We identified the presence of MM-CSCs (CD138- / CD34 + / ALDH1 +, CD19 negative in four wild-type MM lines), and the formation of microspheres in soft agar using RPMI-8226, U266 and SKO-007. All MM cell lines showed *WEE1* expression by qPCR. RPMI-8226 and U266 showed a 50% reduction in cell viability after 24 hours of incubation with MK-1775, at concentrations of 5 μ M and 20 μ M, respectively. SKO-007 showed dose and time dependence to this drug. Combination therapy with bortezomib and MK-1775 abolished the formation of soft agar microspheres in the RPMI-8226 cell line (also responsive to the use of both drugs) and U266, but SKO-007 was resistant to all drugs, isolated and combined. Treatment of bortezomib followed by MK-1775 (sequential treatment) *versus* bortezomib alone showed statistically significant impact on cell lines total apoptosis: 88.8% vs 74.1% in RPMI-8222; 92.5% vs 86.6% in U266; and 60.2% 30.9% on SKO-007 ($p < 0.05$) **Conclusion:** The sequential combination of bortezomib and *WEE1* inhibitor, MK-1775, induced apoptosis in RPMI-8226, U266, and especially SKO-007 cell lines, more

efficiently than the use of the isolated drugs, highlighting its effect in inhibition of proliferation of tumor cells in MM cell lines and, potentially, in MM-CSCs.

Keywords: Multiple myeloma; Cancer stem cells; WEE1; MK-1775.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genes hiper (vermelho), hipo (verde) e normoexpressos (preto) em MM-CSCs em relação aos plasmócitos tumorais. <i>Group1</i> : MM-CSCs; <i>Control Group</i> : Plasmócitos (Oliveira <i>et al</i> , 2016).	5
Figura 2. A) Expressão Relativa dos genes <i>ALDH1</i> em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSCs; B) Expressão Relativa do gene <i>ENG</i> em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSCs; C) Expressão Relativa do gene <i>ITGB1</i> em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSCs; D) Expressão Relativa do gene <i>CXCL8</i> em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSCs; E). Expressão Relativa do gene <i>WEE1</i> em plasmócitos tumorais comparados a MM- CSCs. Teste estatístico: Mann-Whitney.	7
Figura 3. Desenho do estudo.	10
Figura 4. Evolução clonal do mieloma múltiplo em um microambiente permissivo.	13
Figura 5. Critérios diagnósticos das Gamopatias Monoclonais de acordo com o <i>Internatonal Myeloma Working Group</i> .	17
Figura 6. Papel do WEE1 na regulação do ciclo celular e nas vias de reparo de DNA. As células contam com pontos de verificação do ciclo celular e vias de reparo do DNA para garantir a integridade genômica após danos no DNA. A inibição da WEE1 pelo MK-1775, um inibidor específico da WEE1 quinase, anula a parada do G2-M e impulsiona as células para a mitose prematura e consequente morte celular. (Mueller <i>et al.</i> , 2015).	28
Figura 7. Estrutura molecular do MK-1775, fórmula química: C ₂₄ H ₃₂ N ₈ O ₂ (Kreahling <i>et al.</i> , 2011).	31
Figura 8. Piloto da imunofenotipagem e <i>sorting</i> das MM-CSCs e plasmócitos de pacientes com MM. (A) Identificação da população CD138-/CD34+/CD19+/ALDH1+. P1: seleção de células de tamanho médio. P2: exclusão de agregados celulares. P3: seleção das células CD138-. P4: seleção das células CD19+/CD34+. P5: seleção das células ALDH1+. (B) Identificação da população CD138+. P1: seleção de células de tamanho médio. P2: exclusão de agregados celulares. P3: seleção das células	34

CD138+, que serviram como controle nas etapas seguintes do projeto (Oliveira *et al.*, 2016).

Figura 9. Esquema do protocolo modificado para avaliar a formação de microesferas, utilizando linhagens tumorais que crescem em suspensão: esse protocolo foi utilizado tanto para o teste funcional (controles) quanto para inibição de formação de microesferas com fármacos. 40

Figura 10. *Sorting* no FACS Aria II utilizando os anticorpos CD138, CD34, CD19 e Aldefluor. A) Linhagem celular RPMI-8226; B) Linhagem celular U266; C) Linhagem celular SKO-007. 44

Figura 11. Expressão relativa do gene *WEE1* em linhagens celulares de MM por qPCR, utilizando o gene *beta-actina* como controle endógeno e a linhagem com menor expressão do gene alvo (SKMM2) como normalizador. 47

Figura 12: Porcentagem de morte celular para a linhagem SKO-007 após tratamento com bortezomibe, após 48 horas de incubação. Teste realizado em triplicata. 48

Figura 13. Porcentagem de morte celular para a linhagem RPMI-8226 após tratamento com MK-1775, 24 horas de incubação. Teste realizado em triplicata. 49

Figura 14. Porcentagem de morte celular para a linhagem U266 após tratamento com MK-1775, 24 horas de incubação. Teste realizado em triplicata. 49

Figura 15. Porcentagem de morte celular para a linhagem SKO-007 após tratamento com MK-1775, 24 horas de incubação. Teste realizado em triplicata. 50

Figura 16. Porcentagem de morte celular para a linhagem SKO-007 após tratamento com MK-1775, 48 horas de incubação. Teste realizado em triplicata. 51

Figura 17. Avaliação da formação de microesferas na linhagem RPMI-8226. Aumento 250X. Teste realizado em triplicata. 52

Figura 18. Avaliação da formação de microesferas na linhagem U266. Aumento 250X. Teste realizado em triplicata. 52

Figura 19. Avaliação da formação de microesferas na linhagem SKO-007. Aumento 250X. Teste realizado em triplicata. 53

Figura 20. Citometria de fluxo para a linhagem U266, plaqueada sem a adição de fármacos (controle) e analisada 72 horas após o plaqueamento. Gráfico 1: <i>gate</i> contendo as células utilizadas para análise de apoptose (em vermelho). Gráfico 2: quadrantes com as células marcadas por anexina V e/ou PI (eixo Y: PI; eixo X: anexina V). Porcentagem de células em apoptose precoce dispostas no quadrante inferior direito.	54
Figura 21. Porcentagem de células em apoptose precoce na linhagem RPMI-8226 antes e após o uso de bortezomibe e MK-1775. Eixo Y: porcentagem de células marcadas com anexina V; Eixo X: tratamentos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.	55
Figura 22. Porcentagem de células em apoptose precoce na linhagem U266 antes e após o uso de bortezomibe e MK-1775. Eixo Y: porcentagem de células marcadas com anexina V; Eixo X: tratamentos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.	56
Figura 23. Porcentagem de células em apoptose precoce na linhagem SKO-007 antes e após o uso de bortezomibe e MK-1775. Eixo Y: porcentagem de células marcadas com anexina V; Eixo X: tratamentos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.	57
Figura 24. Citometria de fluxo para a linhagem U266, plaqueada sem a adição de fármacos (controle) e analisada 72 horas após o plaqueamento. Porcentagem de células em apoptose tardia dispostas no quadrante superior direito.	58
Figura 25. Porcentagem de células em apoptose tardia na linhagem RPMI-8226 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.	59
Figura 26. Porcentagem de células em apoptose tardia na linhagem U266 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos.	60

*** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

Figura 27. Porcentagem de células em apoptose tardia na linhagem SKO-007 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

61

Figura 28. Citometria de fluxo para a linhagem U266, plaqueada sem a adição de fármacos (controle) e analisada 72 horas após o plaqueamento. Porcentagem de células em apoptose total dispostas nos quadrantes superior e inferior direito.

62

Figura 29. Porcentagem de células em apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) na linhagem RPMI-8226 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

63

Figura 30. Porcentagem de células em apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) na linhagem U266 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

64

Figura 31. Porcentagem de células em apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) na linhagem U266 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. * $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

65

Figura 32. Distribuição de células RPMI-8226 em diferentes estágios do ciclo celular antes e após o tratamento com bortezomibe por 48 horas, seguido de MK-1775 por 6, 12 e 24 horas. Teste realizado em triplicata. Eixo Y: porcentagem de células. Eixo X: fases do ciclo celular. As células com tipo selvagem (WT) e DMSO mostraram a mesma distribuição das fases do ciclo celular. O bortezomibe (48 horas) seguido da incubação MK-1775 (6 ou 12

66

horas) mostrou aumento no subG0 / G1, diminuição na fase S e aumento na porcentagem de células da fase G2 / M.

Figura 33. Esquema do mecanismo de ação de bortezomibe associado ao MK-1175 (inibidor de WEE1) em linhagens celulares de MM, incluindo a população resistente (TP53mut e del17p).

74

Figura 34. Resumo dos resultados obtidos de apoptose total (AT) das linhagens celulares de MM após tratamento com os fármacos isolados e tratamento sequencial (Bortezomibe/MK-1775).

75

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Genes diferencialmente expressos em MM-CSCs em relação aos plasmócitos tumorais, com $p < 0,05$. <i>Fold up-</i> ou <i>down-regulation</i> representa o quanto o gene está mais ou menos expresso nas MM-CSCs (Oliveira <i>et al</i> , 2016).	6
Tabela II. Classificação das alterações moleculares citogenéticas primárias do MM. Adaptado de Rajkumar & Kumar, 2016.	15
Tabela III. Durie-Salmon Staging System para o mieloma múltiplo. (Adaptado de Jakab <i>et al.</i> , 2017).	18
Tabela IV. <i>International Staging System</i> (ISS) para o mieloma múltiplo. (Adaptado de Palumbo <i>et al.</i> , 2015).	19
Tabela V. Fatores de risco e R-ISS para pacientes com MM (Adaptado de Laganà <i>et al.</i> , 2017).	20
Tabela VI. Estratificação de risco Mayo para Mieloma Múltiplo (mSMART). Adaptado de Rajkumar, 2014.	22
Tabela VII. Revisão bibliográfica do perfil imunofenotípico das MM-CSCs.	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ALDH	Aldeído desidrogenase
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
CRAB	Acrônimo de <i>hyperCalcemia, Renal impairment, Anemia and Bbone lesions</i>
CSCs	<i>Cancer stem cells</i> (células-tronco tumorais)
cDNA	<i>DNA complementar</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GMSI	Gamopatia monoclonal de significado indeterminado
MM	Mieloma múltiplo
MM-CSC	Células-tronco tumorais do mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
mSMART	<i>Mayo Stratification for Myeloma and Risk-adapted Therapy</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PET-CT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SFLC	<i>Serum free light chain</i>
Sβ2M	beta-2-microglobulina sérica
TACTH	Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

*Algumas abreviaturas foram mantidas em Inglês para coincidirem com as usadas nas publicações.

SUMÁRIO

Resumo	x
<i>Abstract</i>	xii
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xiv
Lista de abreviaturas	xv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Objetivos	09
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Mieloma Múltiplo: aspectos clínicos e epidemiológicos	12
2.2 Mieloma múltiplo: aspectos moleculares	14
2.3 Diagnóstico e estadiamento	15
2.4 Mieloma múltiplo: Tratamento	20
2.5 Células-tronco tumorais no MM	24
2.6 O gene <i>WEE1</i>	27
2.7 Inibidores de <i>WEE1</i>	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Linhagens Celulares de MM	33
3.2 <i>Sorting</i> das MM-CSC no FACS Canto II	33
3.3 Extração de RNA das linhagens celulares de MM	35
3.4 Síntese do cDNA das linhagens celulares de MM	36
3.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	36
3.6 Avaliação da viabilidade celular	37
3.7 Cultura das células e avaliação da formação de microesferas	38
3.8 Avaliação de apoptose celular	40
3.9 Avaliação do ciclo celular	41
3.10 Análise estatística	41
3.11 Aspectos Éticos	42
4. RESULTADOS	43
4.1 <i>Sorting</i> das MM-CSC no FACS Aria II	44
4.2 Expressão do gene <i>WEE1</i> nas linhagens celulares RPMI-8226, U266, SKO-007 e SKM-M2	47
4.3 Avaliação da viabilidade celular após uso de inibidor de <i>WEE1</i> (MK-1775)	48
4.4 Avaliação da formação de microesferas em <i>soft</i> agar	51

4.5	Análise de apoptose celular induzida por fármacos	53
4.6	Análise do efeito dos fármacos sobre o ciclo celular	65
5.	DISCUSSÃO	67
6.	CONCLUSÕES	77
7.	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE	91
	ANEXOS	95

1. INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é a segunda neoplasia hematológica mais frequente no ocidente, representando aproximadamente 10% de todos os cânceres hematológicos (Kumar *et al.*, 2007) e é caracterizado pela infiltração de plasmócitos tumorais na medula óssea, síntese e secreção de imunoglobulinas monoclonais que podem ser detectadas no soro e/ou urina dos pacientes, além de danos teciduais como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas (Kyle *et al.*, 2004; Kyle *et al.*, 2009).

A introdução de fármacos imunomoduladoras e inibidores do proteassoma, além do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH), permitiu significativo avanço no tratamento do MM e aumento da sobrevida dos pacientes na primeira década desse século (Palumbo *et al.*, 2011).

Estudos envolvendo a combinação de fármacos com diferentes alvos de ação no tratamento de MM têm obtido resultados promissores (Sonneveld *et al.*, 2016; Dimopoulos *et al.*, 2018; Hungria *et al.*, 2019). Atualmente, muitas fármacos receberam aprovação para uso no tratamento de pacientes com recidiva de MM, tais como inibidores de histona desacetilase e anticorpos monoclonais (anti-CD38 e SLAMF7), além da adição de novas gerações de medicamentos já utilizados anteriormente, como os inibidores de proteassoma (Sonneveld *et al.*, 2016). Mas, apesar dos últimos anos terem proporcionado importantes avanços no tratamento do MM, aparentemente nenhum deles ainda é capaz de eliminar todas as células tumorais, justificando a recidiva do MM e seu *status* de doença incurável (Kristinsson *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007; Brenner *et al.*, 2008). A escolha da terapia na recidiva depende de vários fatores, incluindo a eficácia e tolerância à terapia prévia, número de tratamentos

anteriores, tempo desde recaída e agressividade do tumor, idade do paciente e presença de outras comorbidades (Moreau *et al.*, 2017).

A presença de uma rara população (<1% do total de células do tumor) denominada células-tronco tumorais (*cancer stem cells*, CSC) ou células iniciadoras do câncer, têm sido demonstradas em vários tipos de neoplasias (Al-Hajj *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2007).

Propriedades comuns a células-tronco normais têm sido utilizadas por pesquisadores da área para identificar células-tronco tumorais, como a alta resistência a lesões tóxicas decorrente de vários mecanismos celulares de proteção, que incluem elevada expressão de transportadores de fármacos ligados às membranas e enzimas intracelulares de desintoxicação (Hamburger & Salmon, 1977; Dean *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2006). Da mesma forma, as células-tronco tumorais do mieloma múltiplo (MM-CSC) parecem contribuir para a recidiva da doença devido à sua capacidade de resistência a fármacos.

No entanto, o conceito de MM-CSCs ainda é abstrato em vários aspectos (Abe *et al.*, 2014) devido à escassez de métodos sensíveis e confiáveis para sua identificação, mas pode fornecer a explicação para o paradoxo observado no tratamento dos pacientes, no qual as fármacos atuais, apesar de promoverem altas taxas de remissão completa, não são capazes de evitar a recidiva da doença (Huff *et al.*, 2006).

Evidências sugerem que as células que persistem após terapia sejam as MM-CSCs capazes de auto-renovação, diferenciação e aquisição de resistência a múltiplas fármacos através de sinais enviados por uma variedade de células presentes no microambiente tumoral (Matsui *et al.*, 2008; Hajek *et al.*, 2013; Abe *et al.*, 2014). Dessa forma, a identificação de marcadores exclusivos ou

predominantes dessas células se mostra de extrema importância, pois podem revelar possíveis alvos terapêuticos que nos permitam erradicá-las.

Nosso grupo vem tentando identificar e caracterizar as MM-CSCs há alguns anos. Oliveira *et al.* (2016) isolaram prováveis MM-CSCs com base na expressão dos marcadores CD138, CD34, CD19 e ALDH1, através de experimentos de citometria de fluxo, e analisaram o perfil de expressão gênica destas células por PCR *array* a fim de confirmar suas características de célula-tronco tumoral, com foco na descoberta de possíveis alvos terapêuticos.

Apesar da divergência na literatura sobre o fenótipo das MM-CSCs, os experimentos conduzidos pelo nosso grupo, baseados nos marcadores estudados por Boucher *et al.* (2012) (CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+), sugerem que essa população pode, de fato, corresponder às células resistentes à terapia e responsáveis pela recidiva da doença.

A análise dos resultados da matriz de PCR *array* foi realizada através do *software* online *RT² Profiler PCR Array Data Analysis* (versão 3.5), fornecido pelo fabricante da plataforma. O gene constitutivo *GAPDH* foi usado como normalizador para o cálculo de $2^{-\Delta CT}$. *Fold-change* de 2 e $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes, calculadas pelo teste t de Student. O CT para cada gene em cada placa foi automaticamente estabelecido pelo aparelho de Real-Time PCR e todos os CTs foram submetidos ao *software* online para análise.

As prováveis CSCs isoladas dos pacientes, bem como a fração CD138+ dos mesmos (plasmócitos tumorais utilizados como grupo controle), foram submetidas à extração do RNA e a análise do perfil de expressão gênica pela plataforma *RT² ProfilerTM PCR Array Human Cancer Stem Cells* (Qiagen, Hilden,

Alemanha), no aparelho 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) para identificação de genes de *Cancer Stem Cells*. Dos 84 genes presentes na placa, 69 (82%) apresentaram expressão diferencial entre MM-CSCs e plasmócitos tumorais, quando utilizamos o *fold-change* de 2. Desses 69, 12 (17%) apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) quando comparamos as duas populações (Figura 1, Tabela I).

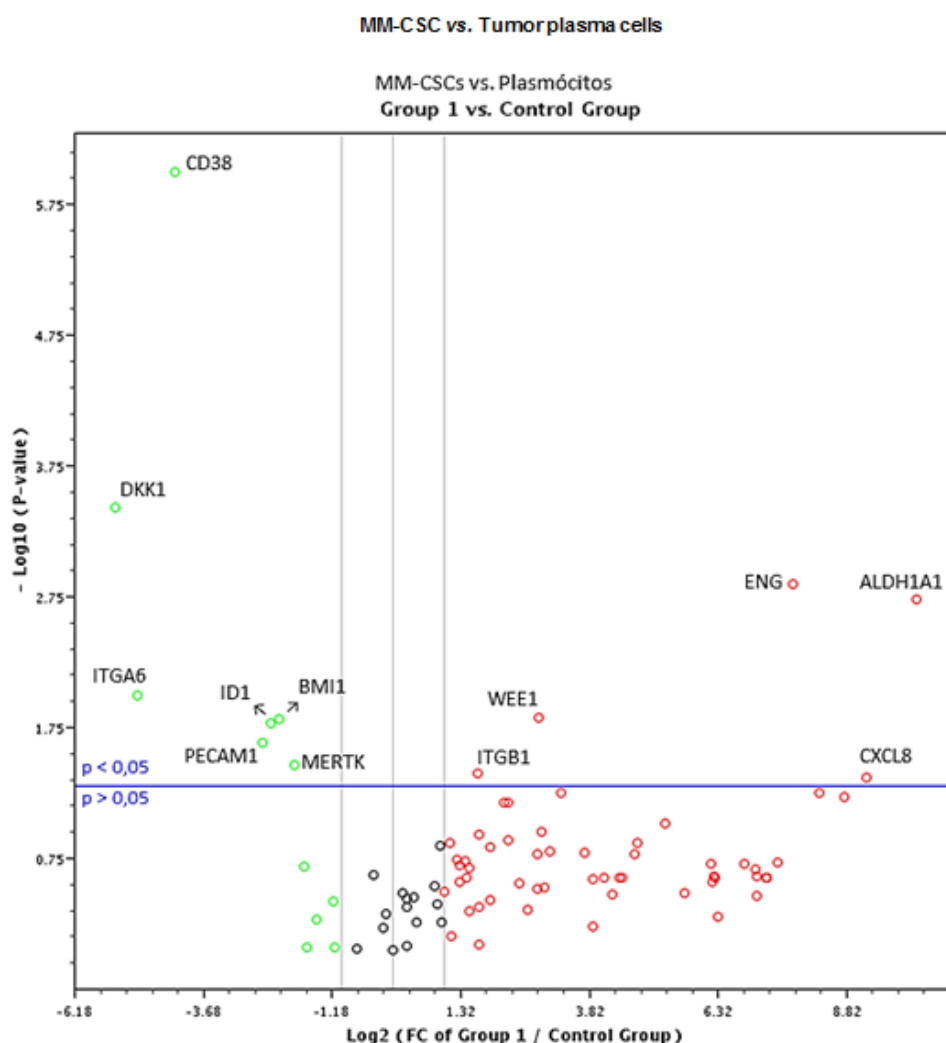


Figura 1. Genes hiper (vermelho), hipo (verde) e normoexpressos (preto) em MM-CSCs em relação aos plasmócitos tumorais. *Group1*: MM-CSCs; *Control Group*: Plasmócitos (Oliveira *et al.*, 2016).

Tabela I. Genes diferencialmente expressos em MM-CSCs em relação aos plasmócitos tumorais, com $p < 0,05$.

* *Fold up- ou down-regulation* representa o quanto o gene está mais ou menos expresso nas MM-CSCs (Oliveira *et al*, 2016).

Gene	p-valor	Fold Up- ou Down - Regulation*
Genes hiperexpressos em plasmócitos tumorais		
<i>BMI1</i>	0,015273	-4,67
<i>CD38</i>	0,000001	-18,78
<i>DKK1</i>	0,000366	-42,21
<i>ID1</i>	0,016537	-5,14
<i>ITGA6</i>	0,01011	-31,34
<i>MERTK</i>	0,034708	-3,76
<i>PECAM1</i>	0,022966	-5,82
Genes hiperexpressos em MM-CSCs		
<i>ALDH1A1</i>	0,00187	1159,54
<i>CXCL8</i>	0,04306	587,96
<i>ENG</i>	0,001413	217,42
<i>ITGB1</i>	0,040016	3,11
<i>WEE1</i>	0,014838	7,15

Dentre os genes hiperexpressos em MM-CSCs, ***ALDH1A1***, ***ENG*** e ***ITGB1*** são marcadores de CSC e estão relacionados a funções de células-tronco; o gene hiperexpresso ***WEE1*** regula o *checkpoint* G2-M do ciclo celular e promove a parada da célula em G2 para posterior reparo do DNA e sobrevivência celular; e ***CXCL8*** (*IL-8*) é um gene envolvido na resposta inflamatória e um potente fator angiogênico, estando relacionado à migração e metástase.

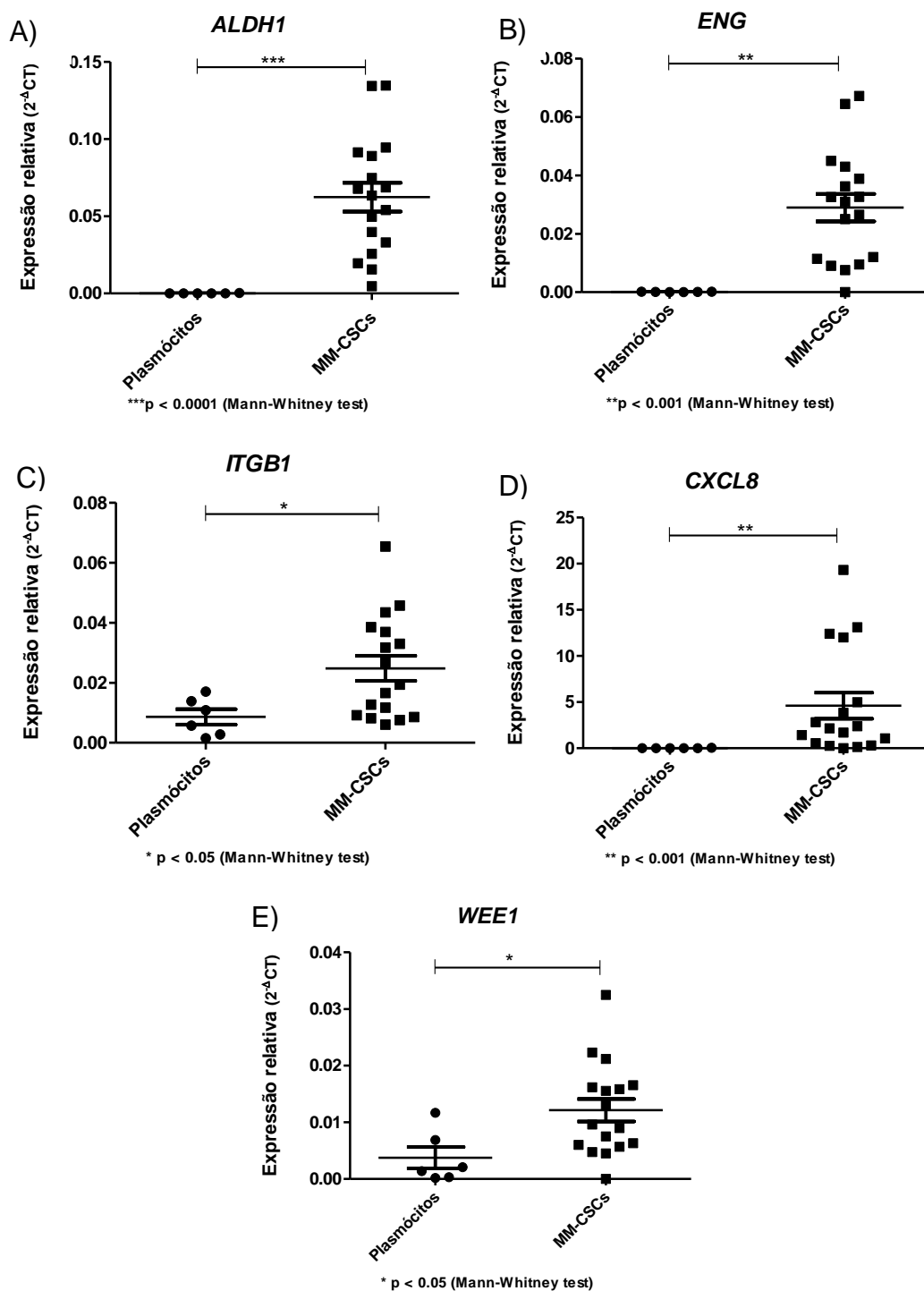


Figura 2. A) Expressão Relativa dos genes *ALDH1* em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSCs. B) Expressão Relativa do gene *ENG* em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSCs; C) Expressão Relativa do gene *ITGB1* em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSCs. D) Expressão Relativa do gene *CXCL8* em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSC; E). Expressão Relativa do gene *WEE1* em plasmócitos tumorais comparados a MM-CSCs. Teste estatístico: Mann-Whitney.

Assim, a análise do perfil de expressão gênica das MM-CSCs mostrou genes importantes diferencialmente expressos em relação aos plasmócitos tumorais, sugerindo alternativas a serem exploradas no tratamento de MM para a erradicação dessas células resistentes à terapia convencional. Entre eles, o gene *WEE1*, por sua atuação no *checkpoint* G2-M e por atuar como um gene de reparo a danos no DNA, nos pareceu bastante atraente. Portanto, um estudo funcional aprofundado se faz necessário para avaliar o real impacto desse gene na fisiopatogenia do MM sendo esse o tema do presente trabalho científico.

1.1 Objetivos

Principal:

Realizar estudos funcionais para avaliar o efeito da inibição do gene *WEE1* em linhagens celulares de MM e seu potencial como alvo-terapêutico.

Específicos:

- 1) Identificar, em linhagens celulares de MM, a presença das possíveis MM-CSCs (CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+) através de *sorting* por citometria de fluxo;
- 2) Avaliar a expressão do gene *WEE1* nas linhagens celulares de MM;
- 3) Avaliar a viabilidade das linhagens celulares de MM, antes e após o tratamento com inibidor de WEE1 (MK-1775) e em combinação com inibidor de proteassoma (bortezomibe);
- 4) Avaliar o efeito do inibidor de WEE1 (MK-1775), isolado ou em combinação com inibidor de proteassoma (bortezomibe), na indução de apoptose e no ciclo celular, utilizando citometria de fluxo, e na formação de microesferas, pelo método de cultura em *soft agar*.

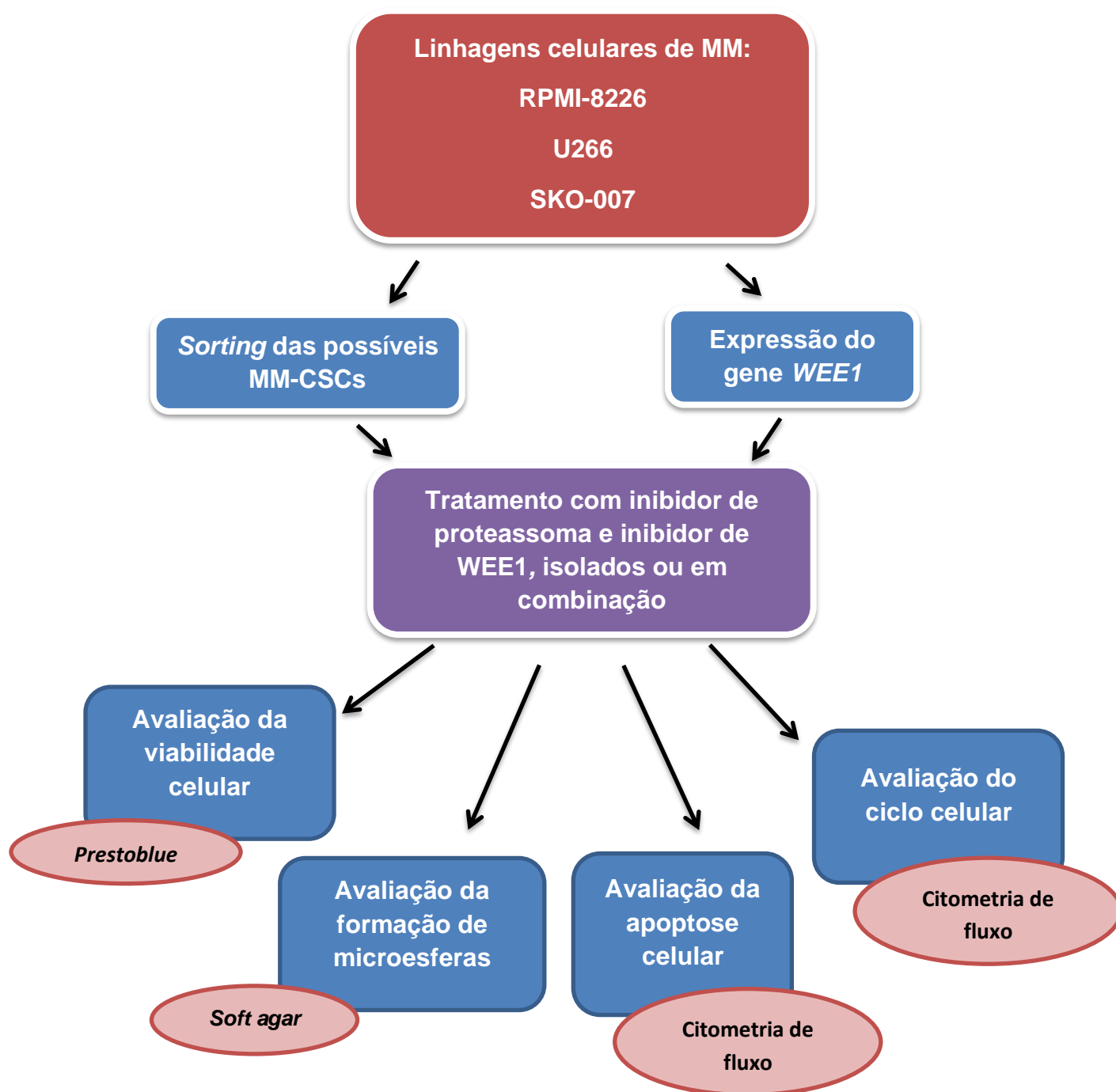


Figura 3. Desenho do estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mieloma Múltiplo: aspectos clínicos e epidemiológicos

O mieloma múltiplo (MM) é a segunda neoplasia hematológica mais frequente no ocidente, representando aproximadamente 10% de todos os cânceres hematológicos (Kumar *et al.*, 2007). É caracterizado pela infiltração de plasmócitos tumorais na medula óssea (MO), síntese e secreção de imunoglobulinas monoclonais que podem ser detectadas no soro e/ou urina dos pacientes, além de danos teciduais como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas (do Inglês CRAB: *hyperCalcemia, Renal impairment, Anemia and Bone lesions*) (Kyle *et al.*, 2004; Kyle *et al.*, 2009).

O MM surge a partir da proliferação de um linfócito B clonal neoplásico e geralmente evolui de uma condição pré-maligna denominada gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI). Essa condição está presente em mais de 3% da população acima de 50 anos e há risco de progressão para MM de 1% ao ano (Kyle & Rajkumar, 2004).

A GMSI é caracterizada por uma concentração de imunoglobulina monoclonal no soro abaixo de 3g/dL, menos que 10% de plasmócitos tumorais na MO e ausência de sintomas relacionados à proliferação dessas células (Go & Rajkumar, 2018). As células de mieloma também podem crescer como tumores localizados denominados plasmocitomas solitários, que podem ficar restritos à medula óssea ou podem ser extra-medulares, na maioria dos casos assintomática (Kyle & Rajkumar, 2009). Há também uma condição com características clínico-laboratoriais intermediárias entre a GMSI e o MM, conhecido como MM indolente caracterizado pela presença de alterações

laboratoriais sem comprometimento clínico, onde há um risco de progressão para MM de 10% ao ano (Figura 2) (Ghobriel & Landgren, 2014).

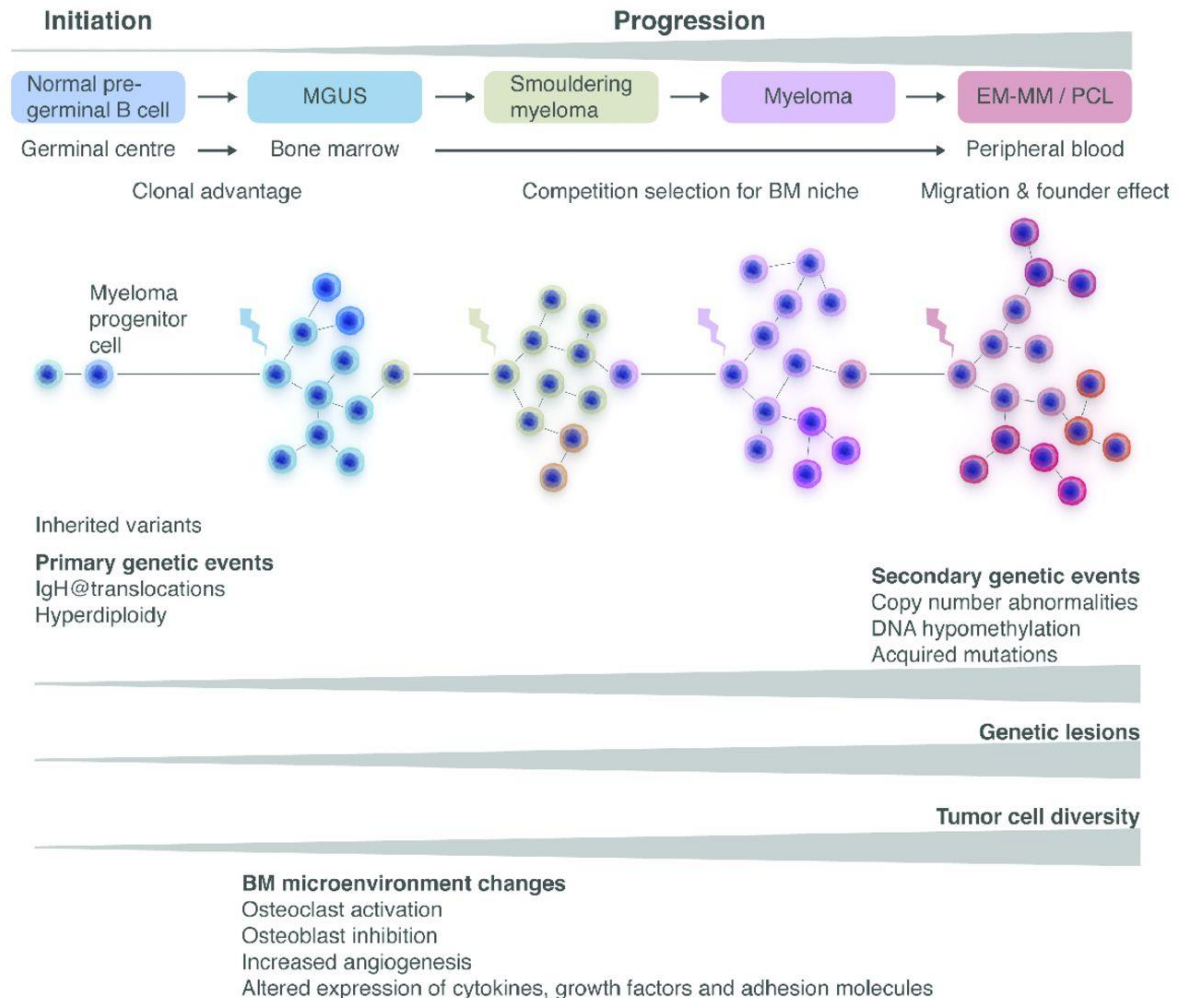


Figura 4. Evolução clonal do mieloma múltiplo em um microambiente permissivo (Engelhardt *et al.*, 2014).

A evolução de GMSI para MM envolve processos heterogêneos dependentes das interações das células tumorais com o microambiente da MO, tais como osteoblastos, osteoclastos e células do sistema imune, tornando-a uma doença de difícil manejo em muitos casos e até o momento sem cura (Ghobriel & Landgren, 2014).

O acrônimo CRAB foi definido em 2003 pelos critérios do *International Myeloma Working Group* para simplificar as manifestações clínicas mais frequentes no mieloma que são hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas. Esse critério pode ser utilizado para distinguir os diferentes estágios da doença e também o tipo de terapia em cada caso, além de sugerir o prognóstico do paciente (*International Myeloma Working Group*, 2003).

Um aumento na incidência de MM vem sendo observado nas últimas décadas devido, principalmente, ao aumento da expectativa de vida da população mundial (Kyle *et al.*, 2009), inclusive da brasileira. A *American Cancer Society* estima que em 2019 cerca de 32.110 novos casos serão diagnosticados nos Estados Unidos, sendo 18.130 em homens e cerca de 12.960 mortes são esperadas em decorrência da doença.

2.2 Mieloma múltiplo: aspectos moleculares

O MM apresenta uma combinação complexa de alterações genéticas e citogenéticas que são marcadores biológicos relacionados a diferentes subgrupos da doença e apresentam valor prognóstico para a tomada de decisões clínicas (Rajkumar & Kumar, 2016).

Aproximadamente 40% dos pacientes com MM apresentam trissomias cromossômicas, e a maioria dos casos possui translocações envolvendo o gene da cadeia pesada da imunoglobulina (*IgH*) no *locus* cromossômico 14q32. Estas são consideradas alterações citogenéticas primárias (Tabela II) e ocorrem no momento do estabelecimento do GMSI (Bergsagel & Kuehl, 2001).

Tabela II. Classificação das alterações moleculares citogenéticas primárias do MM.
Adaptado de Rajkumar & Kumar, 2016.

Subtipo	% de pacientes com MM
Trissomias	42
Translocações <i>IgH</i>	30
t(11;14) (q13;q32)	15
t(4;14) (p16;q32)	6
t(14;16) (q32;q23)	4
Outras translocações <i>IgH</i>	5
Combinação translocação <i>IgH</i> e trissomias	15
Monossomia 14	4,5
Outras anormalidades citogenéticas	5,5
Normal	3

Há outras alterações citogenéticas, denominadas de alterações secundárias, que surgem durante o curso do MM, incluindo ganho (1q), del (1p), del (17p), del (13), mutações no gene *RAS* e translocações secundárias que envolvem o gene *MYC* (Kumar *et al.*, 2012).

As anormalidades citogenéticas primárias e secundárias podem influenciar o curso da doença, a resposta à terapia e o prognóstico; entretanto, fatores como a idade, comorbidades, agressividade da doença, carga tumoral e resposta à terapia são igualmente importantes para a evolução do paciente (Rajkumar & Kumar, 2016).

2.3 Diagnóstico e estadiamento

Para a avaliação diagnóstica do MM, é importante associar achados clínicos, exames laboratoriais, biópsia de MO e métodos de imagem. O diagnóstico dessa condição baseia-se na infiltração de plasmócitos clonais na MO, detecção e quantificação de proteína monoclonal (proteína M) no soro ou

na urina e na evidência de lesões em órgãos-alvo, particularmente hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas (CRAB) (Rajkumar & Kumar, 2016).

Exames laboratoriais iniciais necessários para o diagnóstico de MM incluem: hemograma completo, dosagem de cálcio e creatinina sérica, eletroforese de proteínas na urina e soro, com imunofixação e o teste *serum free light chain* (SFLC), além de tomografia computadorizada (TC) para detecção de lesões ósseas e biópsia da MO para realizar testes de imunofenotipagem, citogenética convencional e FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) (Kyle & Rajkumar, 2009).

A presença do componente monoclonal ou proteína M, está presente em aproximadamente 97% dos casos de MM (Rajkumar *et al.*, 2014). A eletroforese de proteínas é frequentemente usada como teste de triagem para identificar uma proteína monoclonal no soro ou urina em conjunto com a imunoeletroforese de proteínas que confirma a monoclonalidade. O teste *serum free light chain* (SFLC) é importante no diagnóstico de pacientes com MM de cadeia leve que possuam manifestações clínicas (CRAB), mas nenhuma evidência de componente monoclonal nos testes anteriores. Portanto recomenda-se o uso dos três testes para investigação de gamopatias monoclonais (Dispenzieri *et al.*, 2009).

As lesões ósseas podem ser detectadas por ressonância magnética ou tomografia computadorizada, além do PET-CT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons) (Kyle & Rajkumar, 2009).

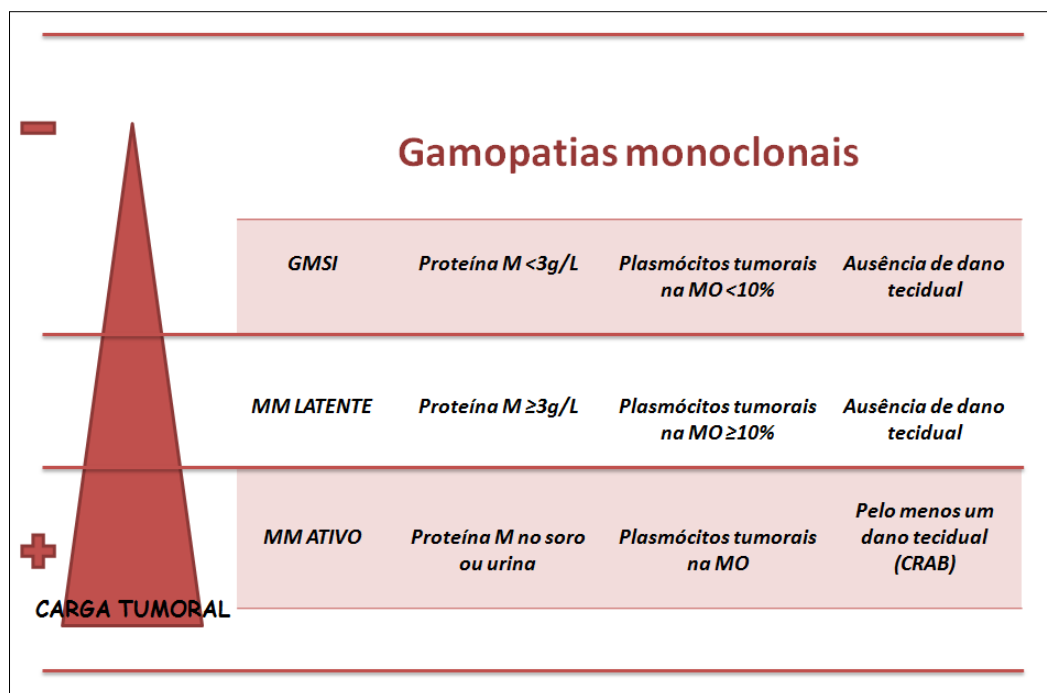


Figura 5. Critérios diagnósticos das gamopatias monoclonais de acordo com o *International Myeloma Working Group*. Adaptado de Dispenzieri *et al.*, 2009.

O *International Myeloma Working Group* (2003) revisou os critérios para o diagnóstico de MM com o intuito de gerar definições simples baseadas em investigações já disponíveis. Na GMSI a proteína M tem valor <3g/L, há menos que 10% de plasmócitos tumorais na MO e não há evidência de dano tecidual. No MM indolente, a proteína M é maior ou igual a 30g/L e pode haver ou não a presença de 10% ou mais plasmócitos tumorais na MO, mas ainda sem comprometimento tecidual. No diagnóstico de MM ativo há a presença de 10% ou mais plasmócitos tumorais na MO, ou plasmocitoma ósseo ou extra-ósseo confirmado por biópsia e um ou mais eventos clínicos (CRAB) (Figura 5).

Em 1975, Durie e Salmon (DS) introduziram um sistema de estadiamento usando parâmetros clínicos comumente disponíveis que previam a carga tumoral do MM (Tabela III).

Tabela III. Durie-Salmon Staging System para o mieloma múltiplo.
(Adaptado de Jakab *et al.*, 2017).

	Estágio I	Estágio II	Estágio III
Massa tumoral	$<0,6 \times 10^{12}$ células/m ²	$0,6-1,2 \times 10^{12}$ células/m ²	$>1,2 \times 10^{12}$ células/m ²
Hemoglobina	>10 g/dL		$<8,5$ g/dL
IgG sérica	<5 g/dL		>7 g/dL
IgA sérica	<3 g/dL		>5 g/dL
Cálcio sérico	Normal		>12 mg/dL
Excreção de Proteína Monoclonal na urina	<4 g/dia		>12 g/dia
Lesões ósseas	Não generalizada		Avançada
Creatinina sérica			A: <2 mg/dL B: ≥ 2 mg/dL

Os critérios do estadiamento de DS incluíram o nível e tipo de proteína monoclonal, hemoglobina, nível de cálcio e número de lesões ósseas. O nível de creatinina (subescala A: creatinina sérica <2 mg / dL e subescala B: creatinina sérica ≥ 2 mg/dL) definiu pacientes com menor ou maior risco em cada um dos três estágios de DS. Esse sistema de estadiamento foi amplamente adotado como padrão para prognóstico em MM mas, na década de 1980, a beta-2-microglobulina sérica (S β 2M) emergiu como o fator prognóstico mais poderoso e foi considerada um preditor confiável de sobrevida em MM (Durie & Salmon, 1975).

Em 2005, foi proposta uma classificação internacional de estadiamento do MM, baseado em dosagens de S β 2M e albumina sérica, como mostra a Tabela IV.

Tabela IV. *International Staging System (ISS)* para o mieloma múltiplo. (Adaptado de Palumbo et al., 2015).

Estágio	Critério	Sobrevivência média (em meses)
I	S β 2M <3,5mg/L Albumina sérica \geq 3,5g/dL	62
II	Não atende aos critérios de Estágio I nem de Estágio III*	44
III	S β 2M \geq 5,5mg/L	29

*Existem duas categorias para o estágio II: beta-2-microglobulina sérica <3,5mg/L e albumina sérica <3,5g/dL; ou S β 2M de 3,5mg/L a <5,5mg/L, independentemente do nível de albumina sérica.

Níveis séricos elevados de β 2-microglobulina refletem alta massa tumoral e função renal reduzida. Baixos níveis de albumina sérica no MM refletem a ação de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 secretada no microambiente do MM (Greipp *et al.*, 2005). O escore ISS fornece informações sobre o prognóstico, identificando três grupos de pacientes com diferentes medianas da sobrevida global: 62 meses no estágio I, 44 meses no estágio II e 29 meses nos grupos do estágio III ($p < 0,001$) (Greipp *et al.*, 2005; Palumbo *et al.*, 2015).

O Sistema de Estadiamento Internacional Revisado (R-ISS) para MM foi desenvolvido para melhor definir o prognóstico de pacientes a longo prazo. No entanto poderá ser utilizado apenas para pacientes recém-diagnosticados, pois não foi validado em mieloma recidivado, mieloma latente ou pacientes com GMSI (Palumbo *et al.*, 2015).

Inclui os parâmetros do ISS (Tabela IV) bem como anomalias citogenéticas e lactato desidrogenase (LDH) (Tabela V). O R-ISS, assim como o ISS, classifica os pacientes em três subgrupos com medianas de sobrevida global em 5 anos significativamente diferente: estágio I (82%), estágio II (62%) e estágio III (40%) (Tabela VII).

Tabela V. Fatores de risco e R-ISS para pacientes com MM (Adaptado de Laganà *et al.*, 2017).

Fator Prognóstico	Critério
Estadiamento ISS	
I	S β 2M <3,5mg/L Albumina sérica \geq 3,5g/dL
II	Não atende aos critérios de Estágio I nem de Estágio III*
III	S β 2M \geq 5,5mg/L
Anomalias cromossômicas (FISH)	
Alto risco	Presença de del(17p) e/ou translocação t(4;14) e /ou translocação t(4;16)
Risco padrão	Ausência de anomalias cromossômicas de alto risco
LDH (lactato desidrogenase)	
Normal	LDH sérico > que o limite superior normal
Alto	LDH sérico > que o limite superior normal
Estadiamento R-ISS	
I	Estadiamento ISS I, FISH e LDH normal
II	Estadiamento intermediário entre R-ISS I e III
III	Estadiamento ISS III ou FISH alto risco ou LDH alto

2.4 Mieloma múltiplo: Tratamento

A escolha do tratamento depende, sobretudo, do estágio da doença e dos sintomas que o paciente apresenta (Rajkumar *et al.*, 2016). O tratamento pode variar entre países e até mesmo em instituições dentro de um mesmo país, mas basicamente é dividida em três fases: terapia inicial, terapia de manutenção e terapia de recidivas (Jakab *et al.*, 2017). Pacientes elegíveis para transplante recebem terapia inicial seguido por coleta de células-tronco hematopoéticas e transplante autólogo (Rajkumar *et al.*, 2016).

Na revisão de Hungria *et al.* (2019) há um excelente compilado de informações sobre o tratamento atual do MM, que será parcialmente reproduzido nesse tópico 2.4:

A mSMART (*Mayo Stratification for Myeloma and Risk-adapted Therapy* – Estratificação Mayo para Mieloma e Terapia Adaptada ao Risco) a recomendação da Mayo Clinic (EUA) considera tanto as alterações citogenéticas (risco básico, intermediário e alto) quanto a elegibilidade ao transplante autólogo de células-tronco (TACTH) para definição do tratamento. Na ausência de trissomias concomitantes, pacientes com deleção 17p, t(14;16) e t(14;20) são considerados portadores de MM de alto risco; pacientes com translocação t(4;14) são considerados de risco intermediário. Todos os outros são considerados como risco básico (Tabela VI). (Rajkumar, 2014; Hungria *et al.* 2019).

Pacientes elegíveis para transplante geralmente recebem quatro ciclos de terapia inicial, seguidos por coleta de células-tronco e TACTH. Os pacientes selecionados com MM de risco básico e que respondem bem à indução podem optar por TACTH tardio. Nesta estratégia, as células-tronco são coletadas após 4 ciclos de terapia inicial e criopreservadas para uso futuro. Pacientes inelegíveis para transplante geralmente são tratados por 12 a 18 meses e, após a terapia inicial, deve-se considerar a manutenção. A escolha da manutenção e duração da terapia são frequentemente orientadas pela presença ou ausência de características citogenéticas de alto risco (Rajkumar & Kumar, 2016; Hungria *et al.* 2019).

Tabela VI. Estratificação de risco Mayo para Mieloma Múltiplo (mSMART). Adaptado de Rajkumar, 2014.

Grupo de Risco	% de pacientes diagnosticados
Risco básico	75%
Trissomias	
t(11;14)	
t(6;14)	
Risco intermediário	10%
t(4;14)	
ganho (1q)	
Risco alto	15%
t(14;16)	
t(14;20)	
del(17p)	

Na versão de 2018, o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) categorizou todos os regimes de terapia de MM como “opções preferenciais”, “outras opções” ou “úteis em determinadas circunstâncias”. O objetivo da classificação de regimes é fornecer orientação sobre a escolha do tratamento considerando as evidências, eficácia relativa, toxicidade e outros fatores, como comorbidades preexistentes, natureza da doença e, em alguns casos, acesso às fármacos (Kumar *et al.*, 2018; Hungria *et al.* 2019).

Para o tratamento de pacientes elegíveis para transplante recém-diagnosticados, os regimes tríplexes listados como opções preferenciais incluem: bortezomibe/lenalidomida/dexametasona (VRd) e bortezomibe/ciclofosfamida/dexametasona (VCd). A terapia de manutenção é realizada com lenalidomida e bortezomibe isoladamente em pacientes elegíveis e não-elegíveis ao TACTH (NCCN *Guidelines Insights: Multiple Myeloma, Version 3.2018*; Hungria *et al.* 2019).

Na recomendação do grupo ESMO (*European Society for Medical Oncology* – Sociedade Europeia para Oncologia Médica) há uma separação entre os pacientes idosos (não transplantados) e pacientes mais jovens (menos do que 65 anos de idade ou pacientes com boas condições clínicas). Para pacientes mais jovens recomenda-se indução seguida de alta dose de terapia e TACTH e para pacientes idosos são recomendados o uso de bortezomibe/melfalano/prednisona ou lenalidomida/dexametasona. A terapia de manutenção sistemática não é recomendada atualmente em pacientes idosos. Em fevereiro de 2017, a *European Medicines Agency* (EMA) aprovou a lenalidomida como monoterapia para a manutenção em pacientes mais jovens que foram submetidos ao TACTH (Moreau *et al.*, 2017; Hungria *et al.* 2019).

Muitas opções de tratamento para a recaída do MM estão disponíveis e a escolha dependerá da disponibilidade da fármaco, resposta a terapias prévias, agressividade da recidiva, elegibilidade ao TACH, e se a recidiva ocorreu enquanto o paciente recebia ou não terapia (Rajkumar & Kumar, 2016; Hungria *et al.* 2019).

Novas terapias incluem inibidores de proteassoma (carfilzomibe, ixazomibe, marizomibe e oprozomibe), fármacos imunomoduladores, inibidores das vias de sinalização, inibidores das histonas desacetilases (vorinostate e panobinostate) e imunoterapia (anti-CD38 daratumumabe) (Runcie & Mark, 2015; Hungria *et al.*, 2019). No entanto, o MM permanece uma doença incurável para a maioria dos pacientes devido ao desenvolvimento de resistência das células tumorais às terapias disponíveis. Sendo assim, é necessário gerar novas opções terapêuticas a partir de novos alvos, mas de forma que haja tolerabilidade e segurança.

2.5 Células-tronco tumorais no MM

As células-tronco tumorais (*cancer stem cells*) têm sido estudadas em vários tipos de neoplasias (Al-Hajj *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2007) e possuem como principais características funcionais a autorrenovação, a iniciação do tumor e o potencial de repopulação do tumor (Cojoc *et al.*, 2015) .

Devido à heterogeneidade das células clonais em MM, subpopulações fenotipicamente diferentes têm sido extensivamente estudadas por seu potencial clonogênico (Abe *et al.*, 2013). Alguns estudos demonstraram que as células B clonais são capazes de dar origem a células plasmáticas secretoras de imunoglobulina monoclonal *in vitro* (Matsui *et al.*, 2004; Boucher *et al.*, 2012). Células clonotípicas CD19+ isoladas e enriquecidas de pacientes com MM mostraram a capacidade de formar um novo tumor em modelos *in vivo* de xenotransplante, o que implica a existência de células com capacidade de autorrenovação entre as células CD19+ clonotípicas B. Matsui *et al.* (2004) descobriram que as células CD19+ CD27+ CD138–, com um fenótipo de células B de memória isoladas do sangue periférico de pacientes com MM, foram capazes de enxertar em camundongos não-obesos diabéticos e com imunodeficiência combinada grave (NOD/SCID) e dar origem a MM maduro CD138+. Células CD19+ isoladas dos camundongos enxertados foram posteriormente confirmadas por formar lesões tumorais em receptores secundários, indicando potencial de auto-renovação. Células progenitoras clonogênicas do tipo MM também foram detectadas com ensaios de colônias *in vitro*. Hamburger e Salmon (1977) relataram que mais de 86% das amostras de tumores de pacientes com MM eram capazes de formar colônias com uma

frequência de 1 em 1.000 a 100.000 células. Matsui *et al.* (2004) também descobriram que as células CD138- CD34- foram capazes de formar colônias *in vitro* com células plasmáticas CD138+ morfologicamente e fenotipicamente maduras, exibindo restrição de cadeia leve de imunoglobulina intracelular compatível com a do paciente com MM. Esses resultados demonstram que células iniciadoras de MM com natureza progenitora tumorigênica existem em células B centro-clonotípicas pós-terminais em MM, que podem diferenciar e reconstituir o tumor das células de MM. Além disso, Boucher *et al.* relataram que as células B produtoras de cadeia leve cresceram em cultura, independentemente da expressão de CD27. Eles também demonstraram a formação de colônias por células B imaturas CD34+ CD19+ além de células B maduras CD34- CD19 +, mas não por células CD34+ CD19- sugerindo que mesmo células B clonotípicas indiferenciadas precoces também podem originar MM.

Paino *et al.* (2012) examinaram a presença de células CD20+ em um painel de linhagens celulares de MM. Uma população muito pequena de células CD20dim+ (0,3%) foi detectada apenas na linhagem celular RPMI8226. No entanto, as células CD20dim+ RPMI8226 não foram essenciais para o enxerto de camundongos CB17-SCID e apresentaram menor potencial de autorrenovação do que as células CDMI-RPMI-8226. Trepel *et al.* (2012) demonstraram, usando sua nova abordagem de rastreamento, que as células B clonotípicas representavam uma população muito rara em pacientes com MM. Estes resultados também podem apoiar a presença de CSCs.

Ensaio de citometria de fluxo com base nos mecanismos de resistência a fármacos ou atividade intracelular da enzima aldeído desidrogenase (ALDH)

têm sido capazes de identificar as células-tronco tumorais em vários tipos de câncer (Storms *et al.*, 1999). Matsui *et al.* (2008) mostraram que as MM-CSCs apresentam aumento da atividade de ALDH1 e Zhou *et al.* (2014) demonstraram que as células ALDH1 positivas têm características de MM-CSCs. A ALDH1 é um marcador fenotípico das células-tronco hematopoéticas normais CD34+. Alguns agentes quimioterápicos produzem aldeídos intermediários tóxicos, levando a célula tumoral à morte. A enzima ALDH detoxifica esses intermediários tóxicos, promovendo a sobrevivência da célula tumoral (Xu *et al.*, 2015).

Vários autores tentaram caracterizar imunofenotipicamente as MM-CSCs, conforme sumarizado na tabela abaixo (Tabela VII). Podemos notar que existe muita controvérsia, mas pelo menos dois autores concordam que as MM-CSCs são CD138-.

Tabela VII. Revisão bibliográfica do perfil imunofenotípico das MM-CSCs.

Autores	Perfil imunofenotípico	Resumo do estudo
Boucher <i>et al.</i>	CD138- /CD19+/CD34+/ALDH1+	58 pacientes com mieloma no momento do diagnóstico ou recidiva. As células B na medula óssea foram avaliadas por citometria de fluxo multicolorida.
Hosen <i>et al.</i>	CD138-/CD19-/CD38+	Xenoinxerto de células CD19+ purificadas de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com MM em camundongos imunodeficientes.
Kim <i>et al.</i>	CD138+/CD19-/CD38+	Xenoinxerto de células CD19 -, CD45low/- e CD135+ em camundongos imunodeficientes.

Vários protocolos com diferentes tipos celulares utilizam a cultura celular *in vitro* conhecida como 3D ou cultura em *soft ágar* para caracterizar o fenótipo de CSC através da formação de microesferas (Horibata *et al.*, 2015; Ishiguro *et*

al., 2017). A cultura celular em *soft agar* é um método que simula condições do microambiente tumoral facilitando a interação entre as células e a formação de microesferas (Horibata *et al.*, 2015) avaliando a capacidade de autorrenovação celular (Bao *et al.*, 2013).

Evidências sugerem que as células que persistem após terapia sejam as MM-CSCs capazes de auto-renovação, diferenciação e aquisição de resistência a múltiplas fármacos através de sinais enviados por uma variedade de células presentes no microambiente tumoral (Matsui *et al.*, 2008; Hajek *et al.*, 2013; Abe *et al.*, 2014). Dessa forma, a identificação de marcadores exclusivos ou predominantes dessas células se mostra de extrema importância, pois podem revelar possíveis alvos terapêuticos que nos permitam erradicá-las.

2.6 O gene *WEE1*

As células normais dependem dos pontos de verificação do ciclo celular (G1, S e G2) para permitir reparo de danos ao DNA antes da divisão celular (M). A inibição dos pontos de verificação do ciclo celular resulta na morte da célula como resultado da persistência de lesões genéticas irreparáveis (Kastan & Bartek, 2004; Hirai *et al.*, 2010).

A entrada na mitose é desencadeada pela quinase CDC2 (também conhecida como CDK1), ligada à ciclina B, e sua atividade é controlada positivamente pela desfosforilação da proteína CDC25 (Figura 6) (Mueller *et al.*, 2015).

A família das quinases WEE1 é composta pelas proteínas WEE1 e MYT1 que atuam como quinases reguladoras do ciclo celular na fase G2/M (Bucher &

Britten, 2008). O gene *WEE1* está localizado no cromossomo 11 (11p15.4) e transcreve a proteína WEE1, predominantemente nuclear. Sua principal função é a inibição (regulação negativa) do complexo CDC2/ciclinaB através da fosforilação do resíduo Tyr15 da molécula CDC2, restringindo sua atividade catalítica e evitando que a célula entre em mitose sem reparar danos ao DNA (Do *et al.*, 2013; Mueller & Haas-Kogan, 2015).

A superexpressão de *WEE1* tem sido observada em várias neoplasias, como carcinoma hepatocelular, câncer de mama e glioblastoma (Masaki *et al.*, 2003; Iorns *et al.*, 2009; Mir *et al.*, 2010) tornando-o um possível alvo terapêutico.

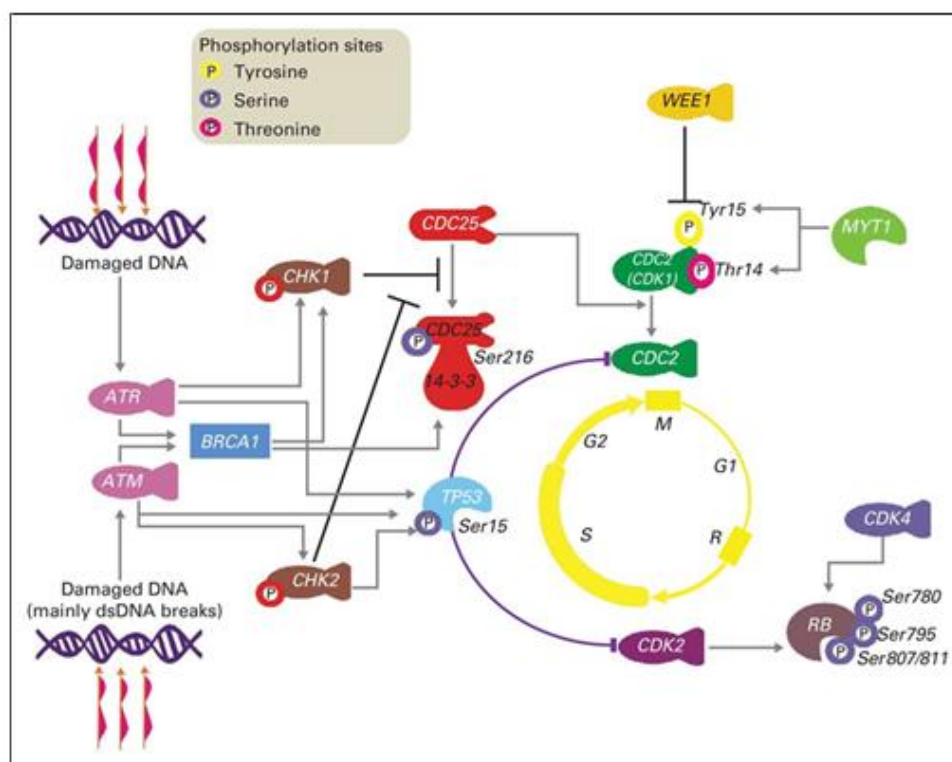


Figura 6. Papel do WEE1 na regulação do ciclo celular e nas vias de reparo de DNA. As células contam com pontos de verificação do ciclo celular e vias de reparo do DNA para garantir a integridade genômica após danos no DNA. A inibição da WEE1 pelo MK-1775, um inibidor específico da WEE1 quinase, anula a parada do G2-M e impulsiona as células para a mitose prematura e consequente morte celular (Mueller *et al.*, 2015).

2.7 Inibidores de WEE1

A inibição de *WEE1* por siRNAs, ou pequenas moléculas inibidoras da expressão do gene, impulsiona a célula para a mitose precoce, levando-a à apoptose, característica que tem sido explorada como estratégia terapêutica em vários tumores como câncer de mama, meduloblastoma e carcinoma hepatocelular (Aarts *et al.*, 2012; Harris *et al.*, 2014; Kogiso *et al.*, 2014).

O MK-1775 (Figura 7) foi a primeira molécula identificada com inibição seletiva de WEE1. Assim, é um agente que inibe principalmente o ponto de verificação G2/M do ciclo celular (Hirai *et al.*, 2010). Além do MK-1775, há também o inibidores PD-0166285 (mais potente e menos seletivo pois, além de inibir o WEE1, inibe fracamente o PKMYT1) e o PD0407824 (menos potente e mais seletivo para o WEE1) (PosthumaDeBoer *et al.*, 2011). Ensaios pré-clínicos demonstraram diminuição da viabilidade celular, da carga tumoral e melhora na sobrevida após inibição de WEE1 pelos inibidores PD0166285, PD0407824 ou MK-1775 (De Witt *et al.*, 2011).

O efeito do MK-1775 como agente antitumoral único demonstrou diminuição na viabilidade celular de linhagens de sarcoma e câncer ovariano (Kreahling *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017). Estudos posteriores determinaram o papel antitumoral sinérgico do MK-1775 em terapias combinadas com agentes que causam dano ao DNA em câncer de ovário, mama, próstata, pâncreas e cólon (Hirai *et al.*, 2010; Bridges *et al.*, 2011; Rajeshkumar *et al.*, 2011). O efeito antitumoral dessas combinações foi detectado mesmo em células tumorais com *TP53* deficiente, sugerindo maior efeito do MK-1775 sobre a viabilidade celular nesse cenário (Hirai *et al.*, 2010; Rajeshkumar *et al.*, 2011). Uma possível

explicação para esse fato é que células tumorais com deficiência no ponto de verificação G1, relacionado ao *TP53* mutado ou deletado, possui uma redução na capacidade de reparo ao DNA, pois há apenas um ponto de verificação no ciclo celular (G2/M) tornando-as mais sensíveis a ação do MK-1175 em comparação com as células normais (Dixon & Norbury, 2002), entrando mais facilmente em apoptose celular.

Assim a utilização de um inibidor de WEE1 parece ser uma estratégia viável em combinação com a terapia de dano ao DNA (De Witt *et al.*, 2011). Nesse estudo utilizaremos, além de um inibidor de WEE1, um inibidor do sistema ubiquitina-proteassoma, o bortezomibe, cujo principal mecanismo de ação é a degradação e remoção de proteínas desnecessárias às células, inclusive proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose e sinalização celular (Myung *et al.*, 2001), atuando de forma indireta no ciclo celular.

Até o momento, não há estudos que utilizaram inibidores de *WEE1* em MM (www.clinicaltrials.gov). No entanto há estudos clínicos para a avaliação do uso do fármaco no tratamento de tumores sólidos (www.clinicaltrials.gov) e estudos em linhagens celulares de tumores hematológicos não-MM (Hirai *et al.*, 2010; Brooks *et al.*, 2011). Diante disso, podemos pensar na molécula de WEE1 como um possível alvo terapêutico a ser explorado no MM, justificando o presente estudo.

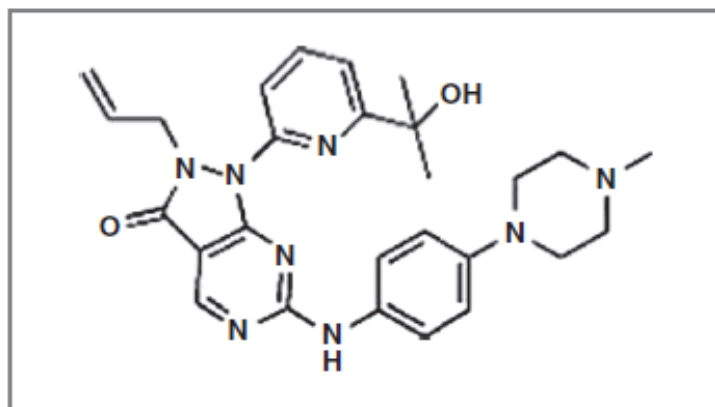


Figure 7. Estrutura molecular do MK-1775, fórmula química: C₂₄H₃₂N₈O₂ (Kreahling et al., 2012).

3.1 Linhagens Celulares de MM

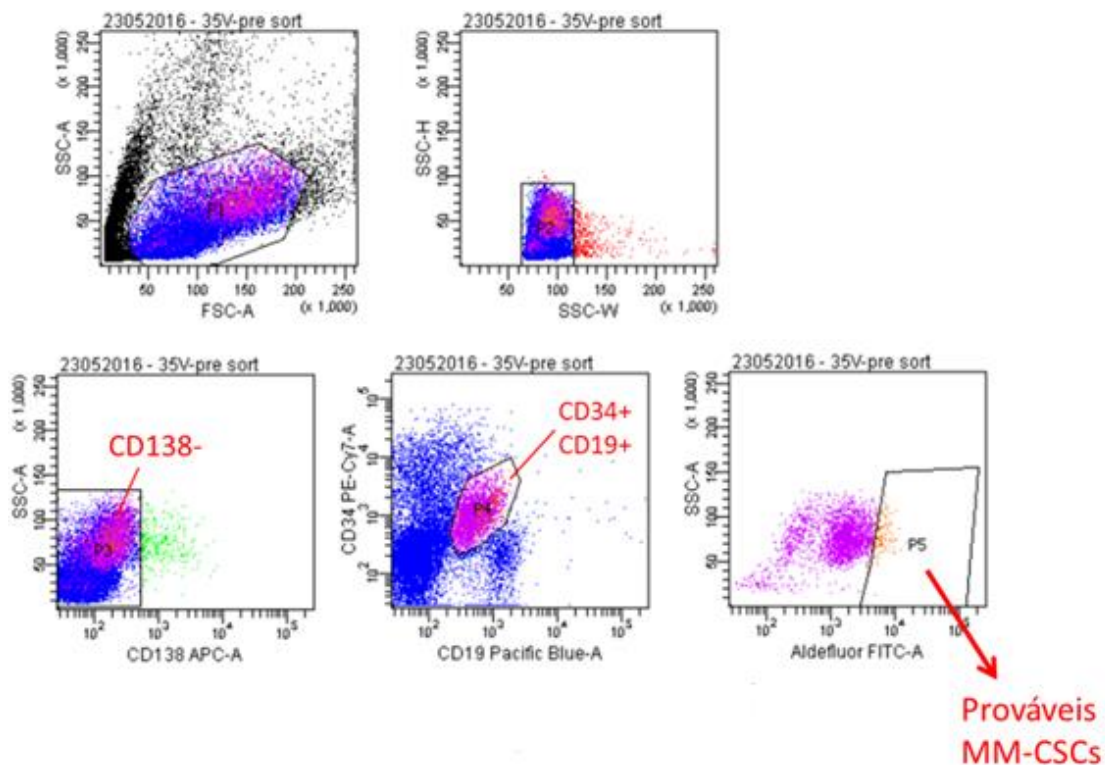
As linhagens celulares de MM RPMI-8226 (Matsuoka *et al.*, 1967), U266 (Nilsson *et al.*, 1970), SKO-007 (Olsson & Kaplan, 1980) e SK-MM2 (Eton *et al.*, 1989) são mantidas em tanque de nitrogênio líquido (-196°C) há 18 anos em nosso laboratório. O cultivo das linhagens celulares de MM foi realizado em meio RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, New York, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de NEAA (aminoácidos não essenciais – Gibco Laboratories, Grand Island, New York, EUA) e 1% de antibiótico penicilina (100U/mL) e streptomina (100µgI./mL) (Gibco Laboratories, Grand Island, New York, EUA), em estufa a 37°C, na presença de 5% de CO₂.

3.2 *Sorting* das MM-CSC no FACS Canto II

Após *sorting* magnético (*Magnetic-Activated Cell Sorting* - MACS, Miltenyi Biotec, Germany) para a seleção de células CD138-, foi realizado novo *sorting* no FACS Aria II, conforme realizado anteriormente nas amostras de MO dos pacientes (Oliveira *et al.*, 2016). A solução de linhagens celulares foi submetida ao *sorting* por citometria de fluxo para identificação e isolamento das possíveis MM-CSCs (CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+) através da marcação com anticorpos monoclonais anti-CD138 APC, anti-CD34 PE Cy7 (ambos da Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e anti-CD19 *Pacific Blue* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), além do reagente Aldefluor™ (StemCell Technology, Vancouver, British Columbia, Canadá).

O isolamento das MM-CSCs foi realizado no aparelho FACS Aria II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) para identificação do perfil de células (prováveis MM-CSC) com a seguinte marcação: CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+, conforme Figura 8.

A



B

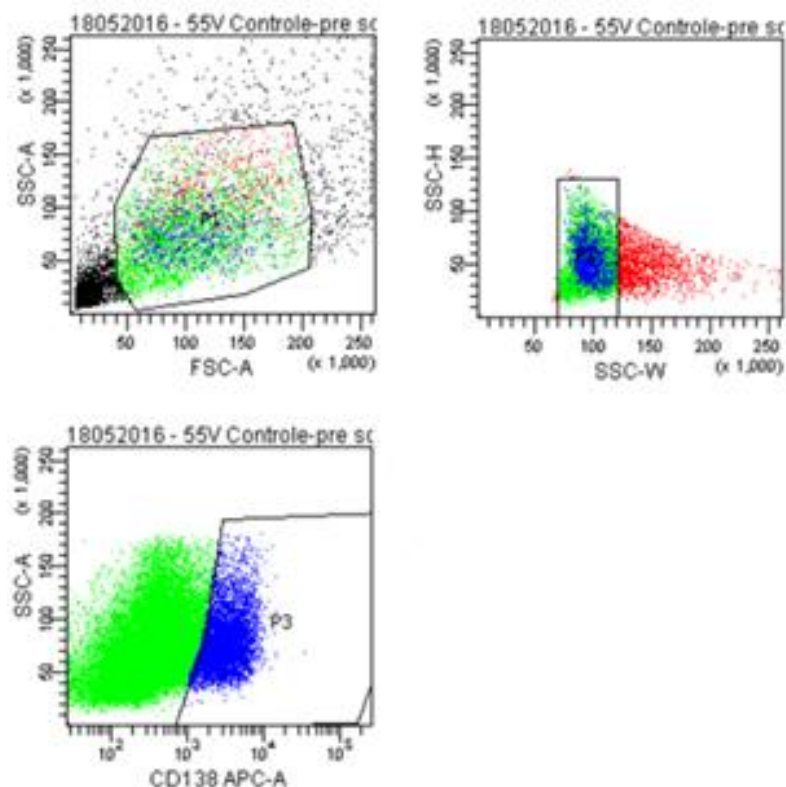


Figura 8. Piloto da imunofenotipagem e *sorting* das MM-CSCs e plasmócitos de pacientes com MM. (A) Identificação da população CD138-/CD34+/CD19+/ALDH1+. P1: seleção de células de tamanho médio. P2: exclusão de agregados celulares. P3: seleção das células CD138-. P4: seleção das células CD19+/CD34+. P5: seleção das células ALDH1+. (B) Identificação da população CD138+. P1: seleção de células de tamanho médio. P2: exclusão de agregados celulares. P3: seleção das células CD138+, que serviram como controle nas etapas seguintes do projeto (Oliveira *et al.*, 2016).

3.3 Extração de RNA das linhagens celulares de MM

A extração do RNA das MM-CSCs foi realizada com o kit *RNeasy Mini kit* (Qiagen, Valencia, California, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida à extração, o RNA foi quantificado pelo espectrofotômetro DS-11 (Denovix, Wilmington, Delaware, EUA).

3.4 Síntese do cDNA das linhagens celulares de MM

Dois microgramas do RNA total das células das linhagens celulares de MM foram reversamente transcritos com a transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Posteriormente, adicionamos os seguintes componentes a um tubo *ependorf* livre de nucleasse: 1 µL de oligo(dT), 10 pg - 5 µg de RNA total, 1 µL de dNTP Mix (10 mM). Completamos para 13 µL com água destilada esterilizada. Aquecemos a mistura por 5 minutos a 65° C e incubamos no gelo por pelo menos 1 minuto. Adicionamos 4 µL de *First Strand Buffer* 5X; 1 µL de DTT 0,1 M; 1 µL de RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor e 1 µL de SuperScript III RT. Misturamos com a ajuda de uma pipeta e incubamos a 50° C por 30 a 60 minutos. Inativamos a reação a 70° C por 15 minutos.

3.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Após extração do RNA e síntese do cDNA, a quantificação da expressão do gene *WEE1* (Hs01119384_g1) foi avaliada nas linhagens celulares RPMI-8226, U266, SKO-007 e SK-MM2 selvagens. O gene constitutivo *β-actina* (ACTB) (Hs99999903_m1) foi utilizado como controle endógeno. *Taqman Master Mix* (AppliedBiosystems, Foster City, California, EUA) foi usado para a realização do qPCR e todas as amostras foram analisadas em triplicata. A fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizada para cálculo da expressão relativa do gene alvo em relação ao gene constitutivo. A linhagem com menor expressão do gene foi utilizada como normalizador.

3.6 Avaliação da viabilidade celular

Para cada poço de uma placa com 6 poços utilizamos 1×10^5 células com um volume final de 3 mL de meio de cultura e em triplicata. Os poços-controle continham células sem nenhum tipo de tratamento e células tratadas com DMSO, diluente dos fármacos; para os poços que receberam tratamento, foram acrescentados bortezomibe ou MK-1775 em diferentes concentrações. As concentrações de bortezomibe utilizadas para cada linhagem celular foram as definidas a partir de estudos anteriores do nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2017). As concentrações de MK-1775 testadas seguiram recomendações do fabricante (Selleckchem, Huston, TX, USA) ou descritas na literatura para outras linhagens celulares (Kreahling *et al.*, 2013; Di Rora *et al.*, 2015; Tabayashi *et al.*, 2016).

A viabilidade celular foi avaliada pelo reagente *PrestoBlue* (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). Após o período de incubação com os fármacos, o conteúdo dos poços foi transferido para um tubo de citometria e centrifugado a 1800 rpm por 4 minutos. Foram retirados 2 mL do sobrenadante, as células foram homogeneizadas e 90 μ L de meio com células foram transferidos para uma placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados 10 μ L do reagente *PrestoBlue* e a placa foi incubada por 2 horas, a 37°C.

A leitura da placa foi realizada no equipamento *FlexStation3* (Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA), utilizando o *software SoftMax Pro 5.3* (Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA). A fluorescência foi determinada nos seguintes comprimentos de onda: 560 nm (excitação) e 590 nm (emissão).

Da média dos valores de fluorescência para cada condição, foi subtraída a média dos valores de fluorescência do controle (“branco”), obtendo-se a média normalizada para cada condição.

3.7 Cultura das células e avaliação da formação de microesferas

Modificamos o protocolo de Horibata *et al.* (2015) que utilizou esse método para a verificação da formação de esferas em células de câncer de mama (que crescem aderidas à placa de cultura). Detalharemos esse método com as modificações, por estar sendo implantado em nosso laboratório no presente estudo e por apresentar uma adaptação bem-sucedida para células que crescem em suspensão, como as do MM (Figura 9).

Para o preparo da solução de agarose a 3% adicionamos, em uma garrafa de vidro, 0,9 g agarose e 30 mL de água destilada, aquecemos a mistura no micro-ondas por 15 segundos e em seguida homogeneizamos suavemente. Para o preparo do meio de cultura utilizamos: meio RPMI-1640, 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e estreptomicina, 1% fungizona e 1% MEM NEAA e aquecemos esse meio em banho-maria a 37°C.

Para a camada inferior transferimos 3 mL da solução de agarose a 3% para um tubo cônico estéril de 50 mL e, em seguida, 12 mL do meio de cultura RPMI-1640, misturando a agarose com o meio sem formar bolhas. Adicionamos com cuidado 2 mL desta mistura em cada poço de uma placa de cultura de 6 poços sem formar bolhas de ar. Incubamos a placa a 4°C durante 1 hora e, após a solidificação da mistura, colocamos a mesma em uma estufa a 37°C durante 30 minutos.

Para a camada intermediária, pipetamos 2 mL da solução de agarose a 3% e em seguida 8 mL de meio RPMI-1640 em um tubo cônico estéril de 50 mL. Adicionamos 3 mL das linhagens celulares contendo $4 \cdot 10^4$ células na proporção 1:1 com o meio de agarose preparado na etapa anterior. Em seguida acrescentamos os fármacos, sem formar bolhas, nas seguintes concentrações: 15nM, 20nM e 10nM para bortezomibe e 5 μ M, 20 μ M e 10 μ M para MK-1775, nas linhagens celulares RPMI-8226, U266 e SKO-007, respectivamente. No tratamento sequencial com bortezomibe+MK-1775, ambas os fármacos foram incubadas simultaneamente nas concentrações descritas anteriormente. Notar que não houve possibilidade de utilizar a combinação dos fármacos bortezomibe+MK-1775 de forma sequencial e ambas foram incorporadas simultaneamente à camada intermediária.

Pipetamos 1mL dessa mistura e adicionamos sobre a camada inferior. Incubamos a placa a 4°C durante pelo menos 15 minutos. Após a solidificação, colocamos a placa em uma estufa a 37° C por 72 horas antes de adicionar a camada de nutrição.

Para a preparação da camada de nutrição misturamos 1 mL de solução de agarose a 3% com 9 mL de meio RPMI-1640 e invertemos suavemente para misturar, evitando formar bolhas de ar. Adicionamos 1 mL dessa mistura em cada poço, incubamos a 4°C durante 15 minutos e, em seguida, mantivemos na estufa a 37°C por mais 72 horas, repetindo esse processo a cada 72 horas até que a formação da colônia fosse observada (geralmente 2 a 3 semanas).

A avaliação da formação das colônias foi qualitativa após varredura de todo o poço, em microscópio invertido, aumento 250 vezes, observando as triplicatas,

para cada situação em relação aos fármacos (bortezomibe, MK-1775, bortezomibe + MK-1775) ou controle (sem fármacos).

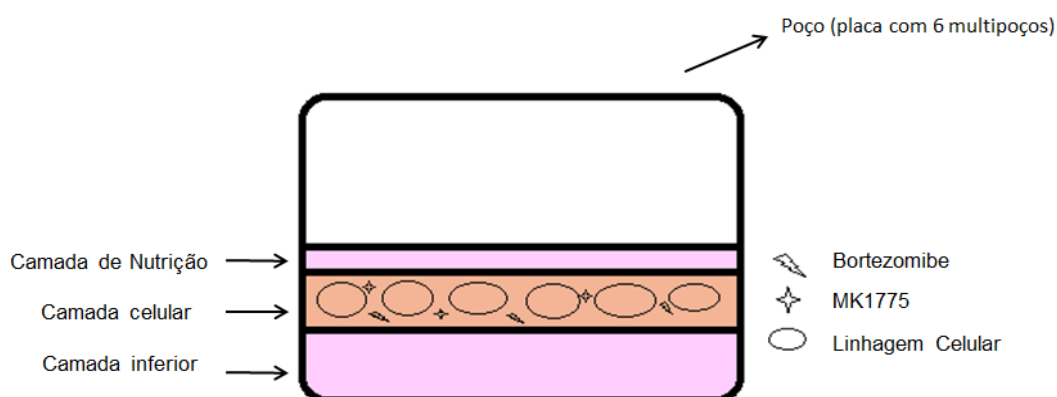


Figura 9. Esquema do protocolo modificado para avaliar a formação de microesferas, utilizando linhagens tumorais que crescem em suspensão: esse protocolo foi utilizado tanto para o teste funcional (controles) quanto para inibição de formação de microesferas com fármacos.

3.8 Avaliação de apoptose celular

Optamos pelo tratamento sequencial de nossas linhagens com o intuito de gerar uma sensibilização celular após administração do bortezomibe (fármaco há muito utilizada como pilar no tratamento de indução dos pacientes com MM) e em seguida administramos o MK-1775, na tentativa de impedir que a célula consiga realizar o reparo através do checkpoint G2/M. As células foram submetidas ao tratamento com bortezomibe, inibidor de WEE1 (MK-1775) ou ambos. Após 24 horas sob o efeito da fármaco, realizamos a avaliação da apoptose por citometria de fluxo no FACS Callibur (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA), utilizando como parâmetro as marcações com anexina V e PI (iodeto de propídeo), para garantir a identificação de células

no estágio inicial (apoptose precoce) e final (apoptose tardia) de morte celular causada pelo tratamento com o inibidor.

3.9 Avaliação do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular, utilizamos 1×10^5 células da linhagem celular RPMI-8226. Após tratamento com bortezomibe por 48 horas e sequencialmente com MK-1775 por 6, 12 e 24 horas, as células foram centrifugadas a 1800 rpm por 4 minutos, ressuspensas em PBS e lavadas novamente. O sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas com tripsina em tampão citrato e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, adicionamos ribonuclease com tripsina inibidora em tampão citrato e incubamos por mais dez minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Por fim, adicionamos iodeto de propídeo com *spermine* 4HCL em tampão citrato e incubamos por 2 horas, protegidos da luz e em temperatura ambiente. As porcentagens de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular foram identificadas por citometria de fluxo através do equipamento BD FACSCanto II™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). A distribuição do ciclo celular foi calculada com o software ModFit LT 5.0 (Verity software House, Topsham, ME, USA).

3.10 Análise estatística

As comparações entre as porcentagem de apoptose precoce, tardia e total em diferentes grupos de tratamento foi realizada com o teste *One-Way*

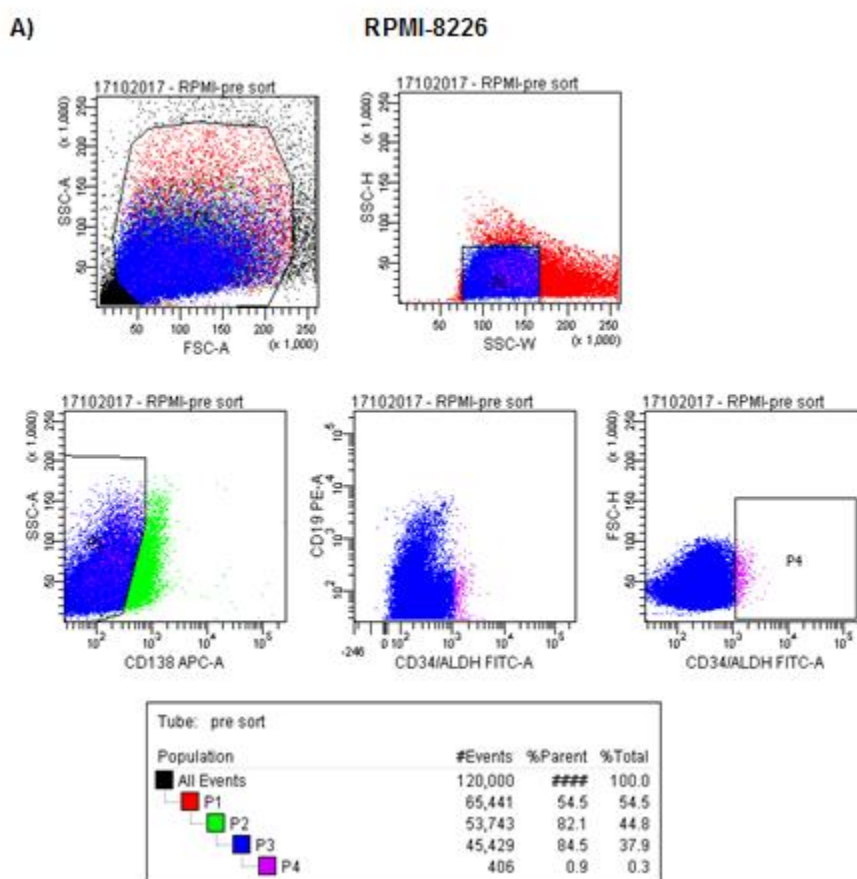
ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, usando GraphpadPrism (versão 5.01), sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

3.11 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP via Plataforma Brasil (0739/2018) como adendo ao projeto já aprovado sob o número 0127/2014 (Anexos 1 e 2).

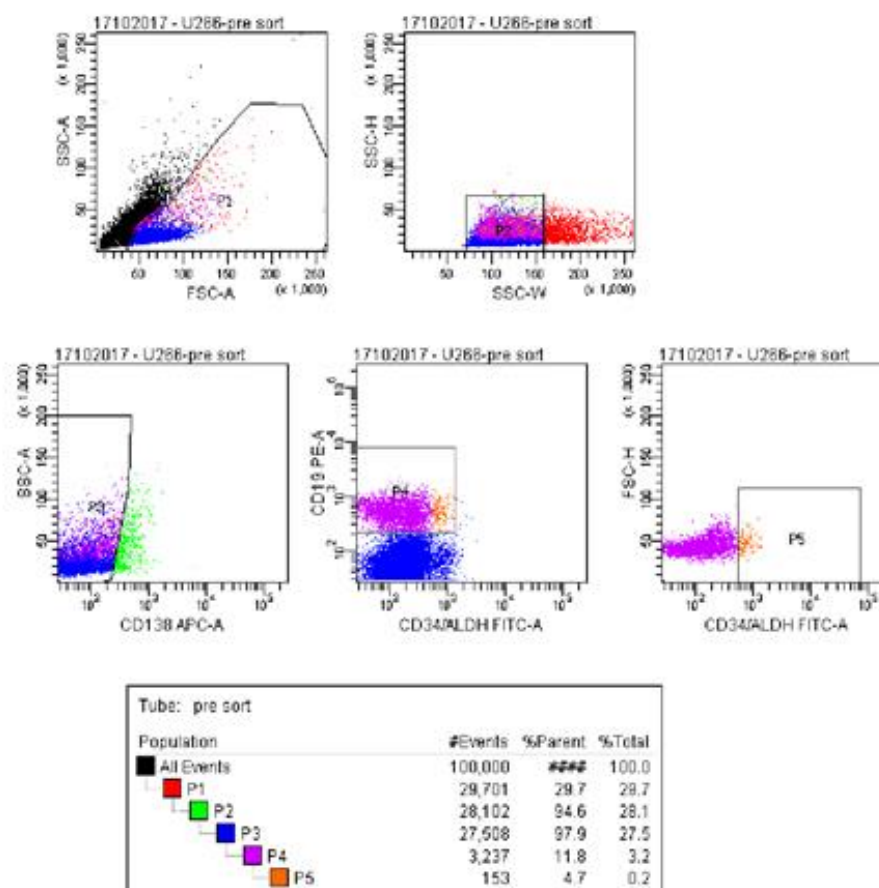
4.1 Sorting das MM-CSC no FACSaria II

Após *sorting* magnético (*Magnetic-Activated Cell Sorting* - MACS, Miltenyi Biotec, Germany) para a seleção de células CD138-, foi realizado novo *sorting* no FACSaria II utilizando os anticorpos anti-CD138, anti-CD19 anti-CD34 e o reagente Aldefluor. O experimento foi realizado em triplicata nas linhagens celulares RPMI-8226, U266 e SKO-007. A linhagem celular SKM-M2 não apresentou crescimento satisfatório em cultura e foi utilizada apenas para os experimentos de qPCR, que exigiam menor quantidade de células.



B)

U266



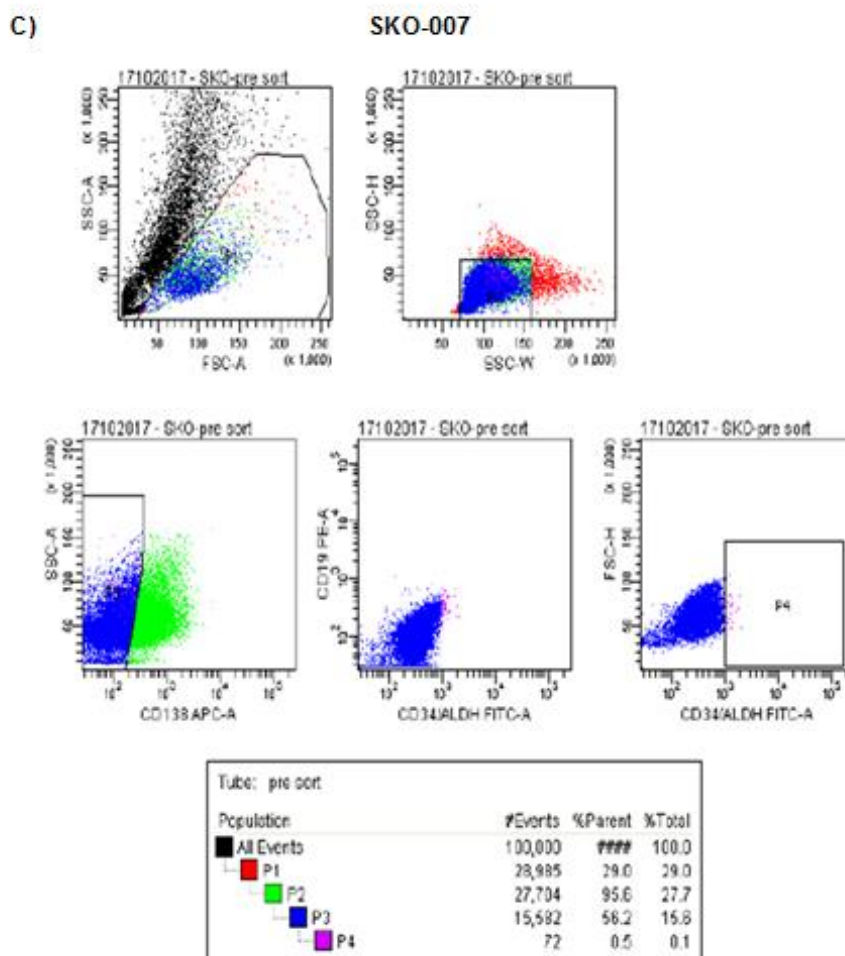


Figura 10. *Sorting* no FACS Aria II utilizando os anticorpos CD138, CD34, CD19 e Aldefluor. **A)** Linhagem celular RPMI-8226; **B)** Linhagem celular U266; **C)** Linhagem celular SKO-007.

Baseados em dados da literatura e nos experimentos realizados anteriormente por nosso grupo com amostras de pacientes com MM, sabemos que as células de interesse para esse trabalho seriam CD138-/CD34+/CD19+/ALDH+; no entanto, as linhagens celulares RPMI-8226, U266 e SKO-007 não expressam CD19 (Figura 9), diferentemente das células primárias dos pacientes com MM.

Para avaliar o potencial das células isoladas das linhagens celulares em formar microesferas, característica funcional das células-tronco tumorais, o material obtido através do *sorting* (CD138-/CD19-/CD34+/ALDH1+) foi

submetido à cultura em meio RPMI com NEAA sem SFB. Após 15 dias, não houve crescimento celular e, conseqüentemente, não houve formação de esferas.

4.2 Expressão do gene *WEE1* nas linhagens celulares RPMI-8226, U266, SKO-007 e SKM-M2

A análise relativa da expressão gênica de *WEE1* foi realizada utilizando a linhagem SK-MM2 como comparador, em triplicata. As quatro linhagens de MM apresentaram expressão do gene *WEE1*, sendo a linhagem U266 a que apresentou maior expressão, seguida da linhagem SKO-007. As linhagens RPMI-8226 e SKM-M2 apresentaram a menor expressão para o gene *WEE1*.

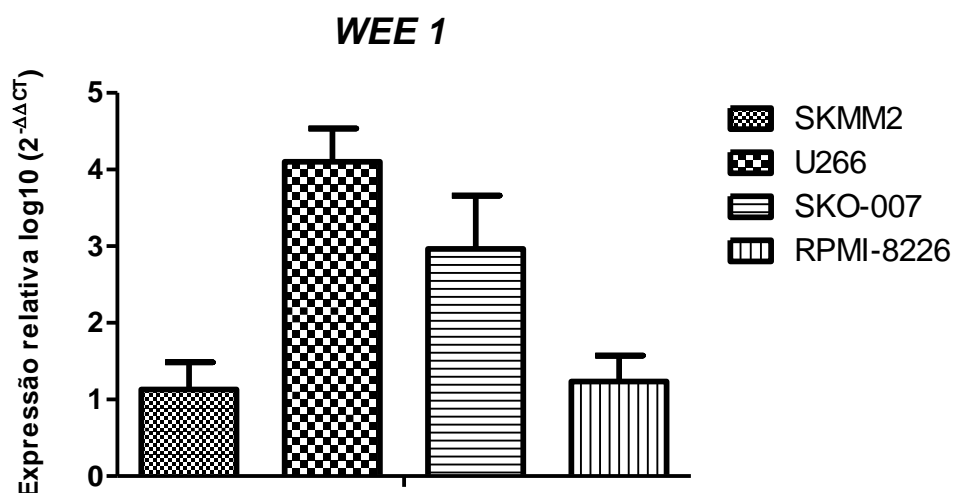


Figura 11. Expressão relativa do gene *WEE1* em linhagens celulares de MM por qPCR, utilizando o gene *beta-actina* como controle endógeno e a linhagem com menor expressão do gene alvo (SKMM2) como normalizador.

4.3 Avaliação da viabilidade celular após uso de inibidor de *WEE1* (MK-1775)

As concentrações de bortezomibe utilizadas no tratamento das linhagens celulares RPMI-8226 e U266 foram as definidas a partir de estudos anteriores do nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2017). Para a linhagem SKO-007 foi realizado o mesmo teste de viabilidade celular (Prestoblue) para obtermos aproximadamente 50% de morte celular (Figura 12). Essa linhagem necessitou de 48 horas de incubação para que o objetivo fosse atingido.

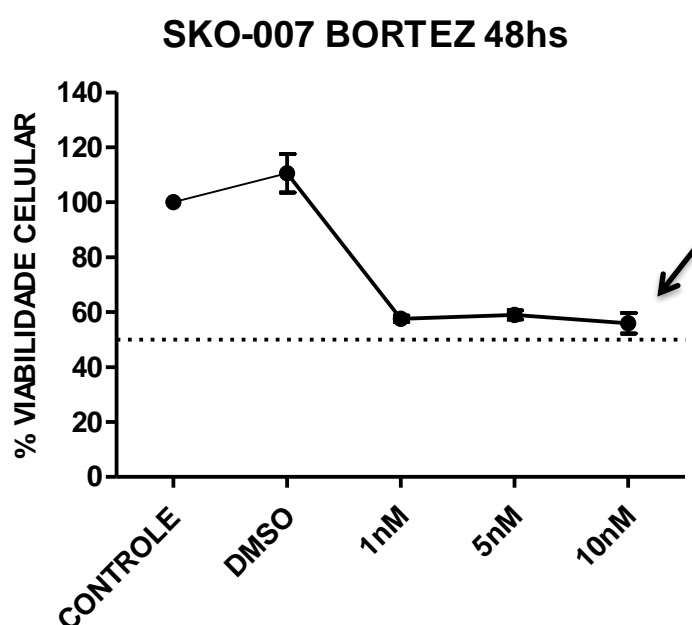


Figura 12: Porcentagem de morte celular para a linhagem SKO-007 após tratamento com bortezomibe, 48 horas de incubação. Valores da mediana, mínimo e máximo. Teste realizado em triplicata.

Assim, as concentrações de bortezomibe utilizadas nos ensaios subsequentes foram: RPMI-8226 15nM, U266 20nM e SKO-007 10nM. Para todas as linhagens o tempo de incubação com bortezomibe foi de 48 horas (Oliveira *et al.*, 2017).

Obtivemos aproximadamente 50% de morte celular quando a linhagem RPMI-8226 foi incubada por 24 horas com a concentração de 5 μ M de MK-1775 (Figura 13).

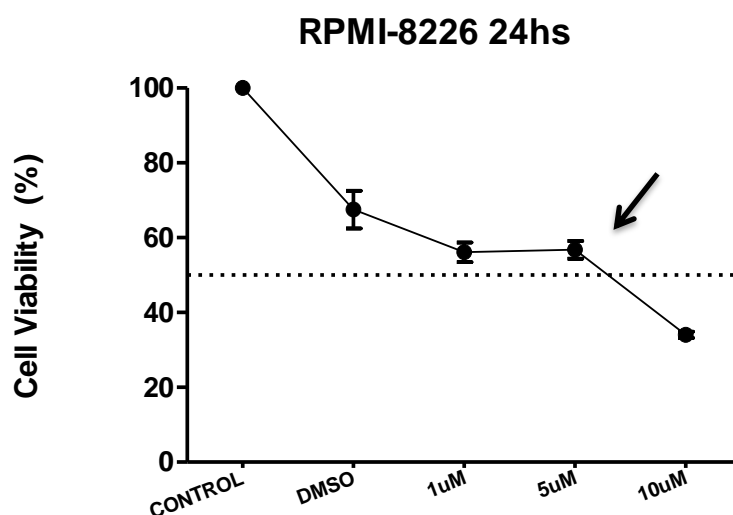


Figura 13. Porcentagem de morte celular para a linhagem RPMI-8226 após tratamento com MK-1775, 24 horas de incubação. Valores da mediana, mínimo e máximo. Teste realizado em triplicata.

Para a linhagem U266, obtivemos resultado semelhante na concentração de 20 μ M de MK-177, após 24 horas de incubação (Figura 14).

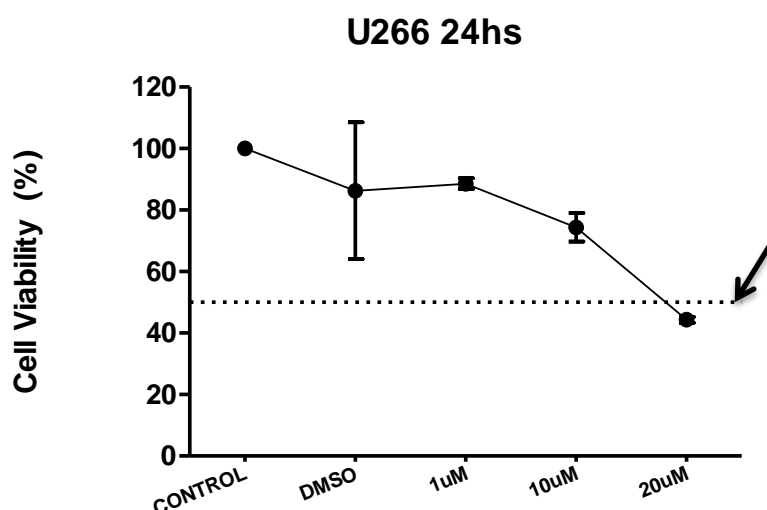


Figura 14. Porcentagem de morte celular para a linhagem U266 após tratamento com MK-1775, 24 horas de incubação. Valores da mediana, mínimo e máximo. Teste realizado em triplicata.

Para a linhagem SKO-007 após tratamento com MK-1775 durante 24 horas não alcançamos 50% de morte celular em nenhuma das concentrações testadas (1 a 10 μ M) (Figura 15).

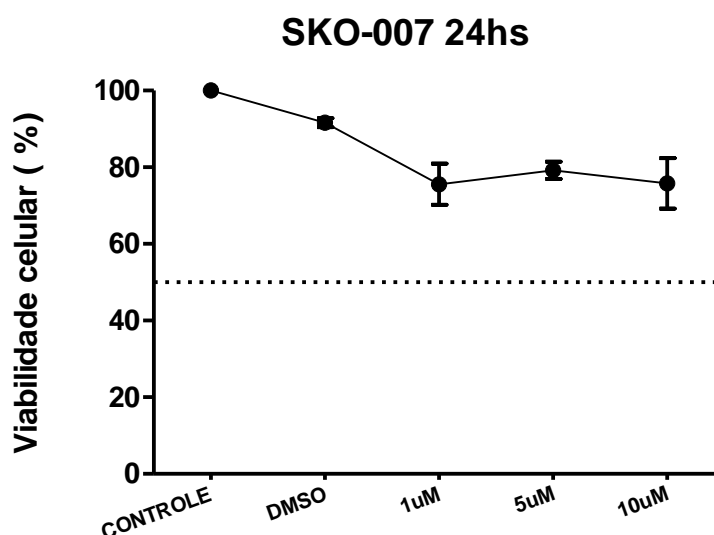


Figura 15. Porcentagem de morte celular para a linhagem SKO-007 após tratamento com MK-1775, 24 horas de incubação. Valores da mediana, mínimo e máximo. Teste realizado em triplicata.

Diante disso, optamos por aumentar o período de incubação com a fármaco para 48 horas, supondo que para essa linhagem o efeito do fármaco poderia ser tempo-dependente e não apenas dose-dependente como as linhagens U266 e RPMI-8226. Assim, alcançamos 50% de morte celular na concentração de 10 μ M de MK-1775, após incubação por 48 horas (Figura 16).

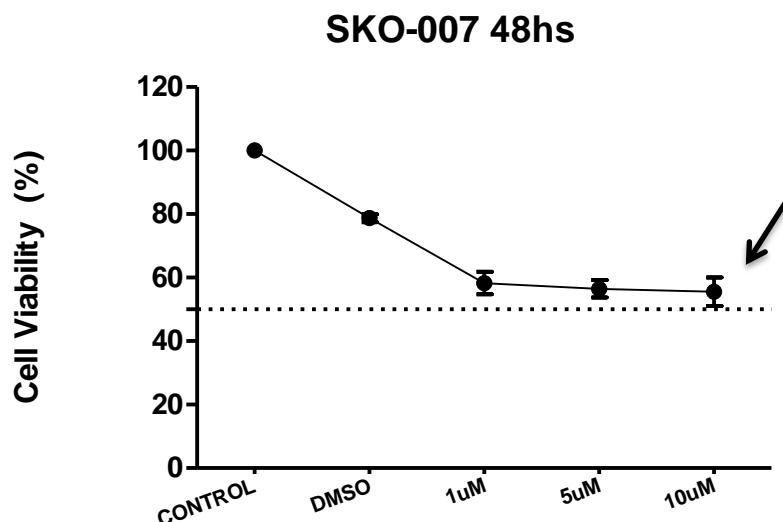


Figura 16. Porcentagem de morte celular para a linhagem SKO-007 após tratamento com MK-1775, 48 horas de incubação. Valores da mediana, mínimo e máximo. Teste realizado em triplicata.

4.4 Avaliação da formação de microesferas em *soft agar*

Modificamos o protocolo de Horibata *et al.*, 2015, que utilizou esse método para a verificação da formação de esferas em células de câncer de mama. Para esse teste utilizamos as linhagens celulares RPMI-8226, U266 e SKO-007. Nós mantivemos as células em cultura durante 2 semanas e meia em quatro condições diferentes: Ágar + células; Ágar + células + bortezomibe; Ágar + células + MK-1775; Ágar + células + bortezomibe+MK-1775, todas em triplicatas.

Na linhagem RPMI-8226, houve formação de microesferas nos poços controle (onde haviam apenas células) e houve crescimento de pequenos agrupamentos de células nos poços que receberam MK-1775. Não houve formação de microesferas nos poços que receberam apenas bortezomibe e nos poços que receberam a combinação dos fármacos (Figura 17), sugerindo que a inibição de proliferação de MM-CSCs nessa linhagem pode ser secundária apenas ao bortezomibe.

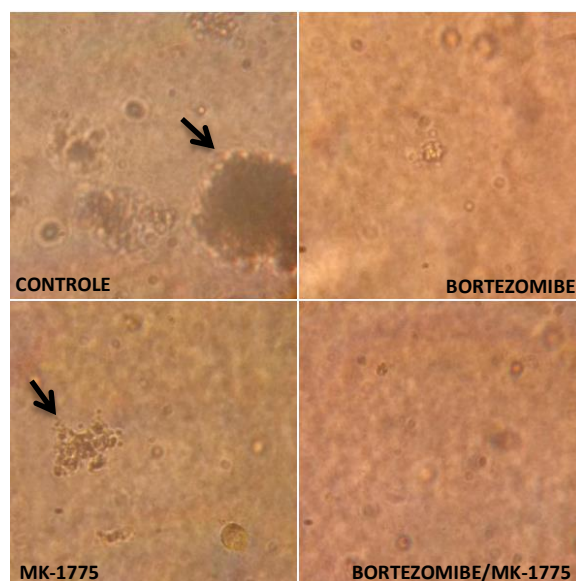


Figura 17. Avaliação da formação de microesferas na linhagem RPMI-8226. Aumento 250X. Teste realizado em triplicata.

Na linhagem U266, houve formação de microesferas somente nos poços controle (onde havia apenas células). Não houve formação de microesferas nos poços que receberam apenas bortezomibe, nos poços que receberam apenas MK-1775 e nos poços que receberam a combinação dos fármacos (Figura 18), sugerindo potencial da inibição de proliferação de MM-CSCs com qualquer um dos fármacos nessa linhagem celular.

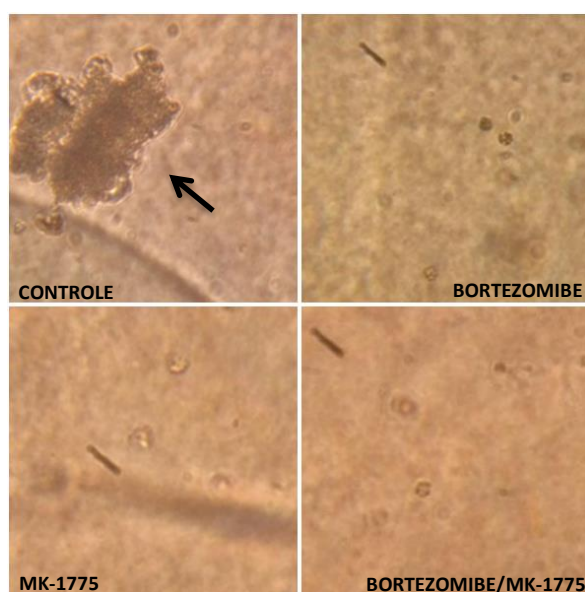


Figura 18. Avaliação da formação de microesferas na linhagem U266. Aumento 250X. Teste realizado em triplicata.

Na linhagem SKO-007, houve formação de microesferas em todos os poços, mas com crescimento de pequenos agrupamentos de células, diferente do crescimento no poço controle das linhagens celulares RPMI-8226 e U266, sugerindo que essa linhagem celular é mais resistente ao tratamento independente do fármaco utilizado (Figura 19).

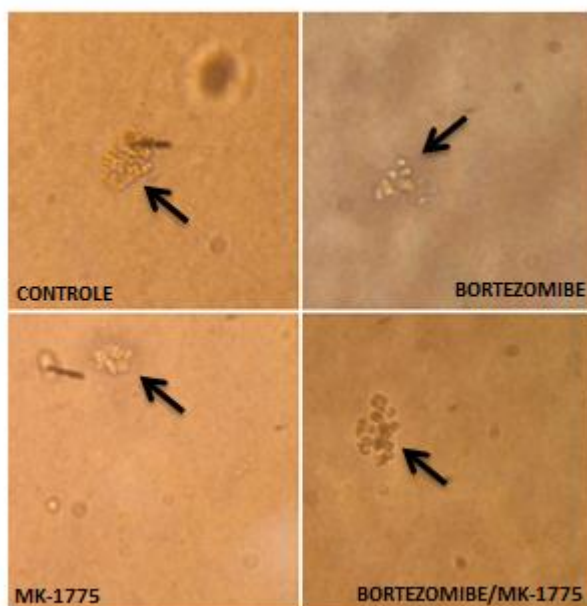


Figura 19. Avaliação da formação de microesferas na linhagem SKO-007. Aumento 250X. Teste realizado em triplicata.

4.5 Análise de apoptose celular induzida por fármacos

As linhagens celulares RPMI-8226, U266 e SKO-007 foram tratadas com bortezomibe (15nM, 20nM e 10nM, respectivamente), MK-1775 (5 μ M, 20 μ M e 10 μ M, respectivamente) e o tratamento sequencial com as fármacos (bortezomibe seguido de MK-1775), além dos grupos controle (sem tratamento e DMSO). Após o período de incubação (48 horas para bortezomibe em todas as linhagens e 24 horas para MK-1775 para as linhagens U266 e RPMI-8226 e 48 horas para a linhagem SKO-007) as células foram marcadas com Anexina V e PI (iodeto de propídeo) e posteriormente avaliadas no citômetro de fluxo.

Analizamos inicialmente as células presentes no quadrante inferior direito, marcadas apenas com Anexina V (apoptose precoce) (Figura 20).

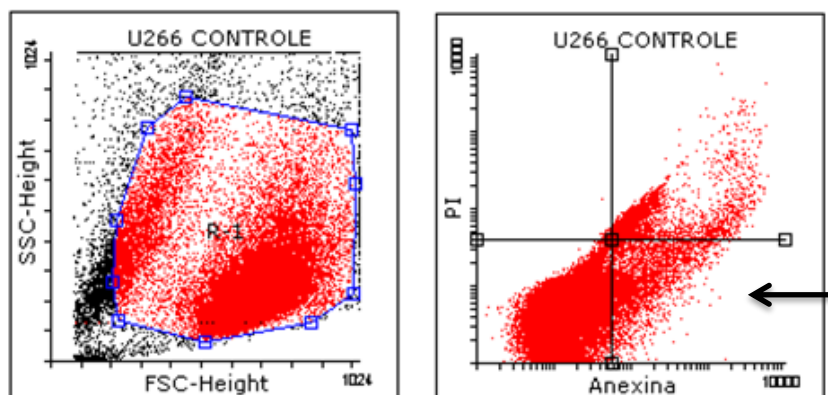


Figura 20. Citometria de fluxo para a linhagem U266, plaqueada sem a adição de fármacos (controle) e analisada 72 horas após o plaqueamento. Gráfico 1: *gate* contendo as células utilizadas para análise de apoptose (em vermelho). Gráfico 2: quadrantes com as células marcadas por anexina V e/ou PI (eixo Y: PI; eixo X: anexina V). Porcentagem de células em apoptose precoce dispostas no quadrante inferior direito.

A linhagem RPMI-8226 apresentou média de triplicatas de 2,7%, 3,5%, 28,3%, 32,5% e 50,0% de apoptose precoce nas células não-tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação dos fármacos, respectivamente (Figura 21).

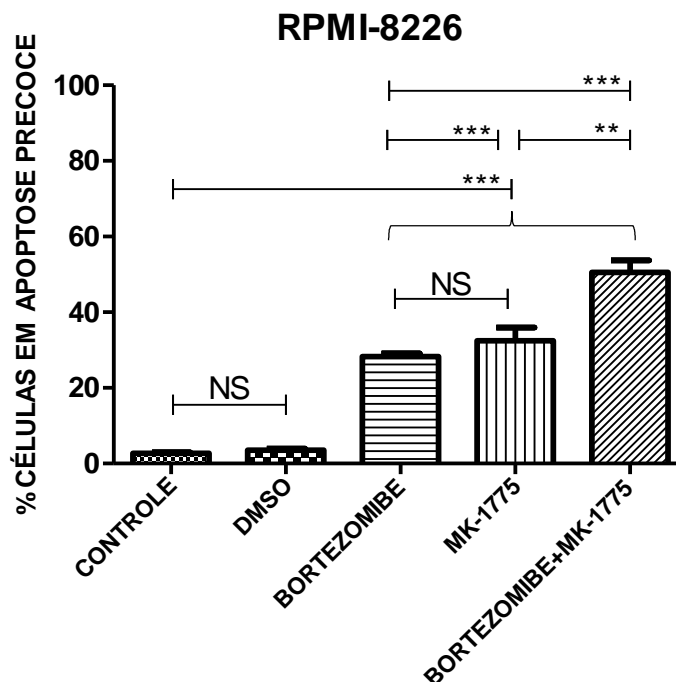


Figura 21. Porcentagem de células em apoptose precoce na linhagem RPMI-8226 antes e após o uso de bortezomibe e MK-1775. Eixo Y: porcentagem de células marcadas com anexina V; Eixo X: tratamentos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

A linhagem U266 apresentou média de triplicatas de 6,8%, 7,4%, 16,2%, 23,3% e 38,3% de apoptose precoce nas células não-tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação dos fármacos, respectivamente (Figura 22).

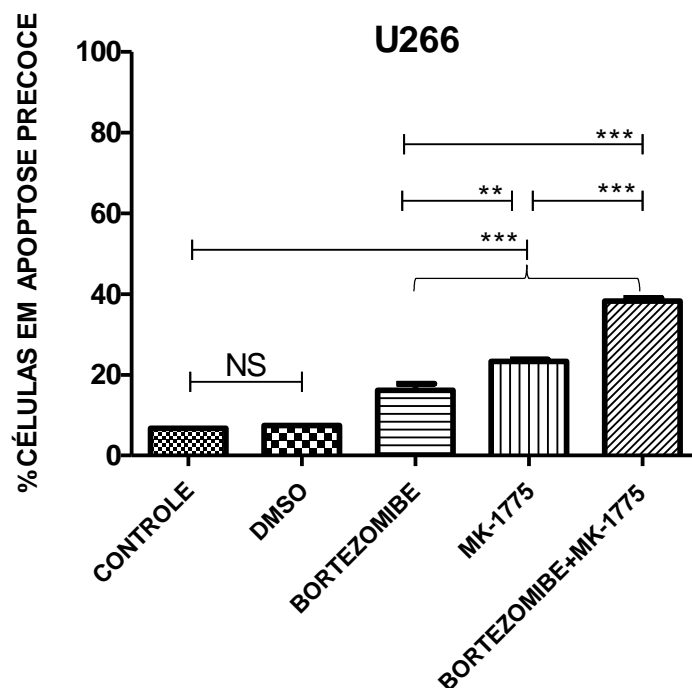


Figura 22. Porcentagem de células em apoptose precoce na linhagem U266 antes e após o uso de bortezomibe e MK-1775. Eixo Y: porcentagem de células marcadas com anexina V; Eixo X: tratamentos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

A linhagem SKO-007 apresentou média de triplicatas de 17,7%, 18,7%, 9,2%, 31,6% e 6,2% de apoptose precoce nas células não-tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação dos fármacos, respectivamente (Figura 23).

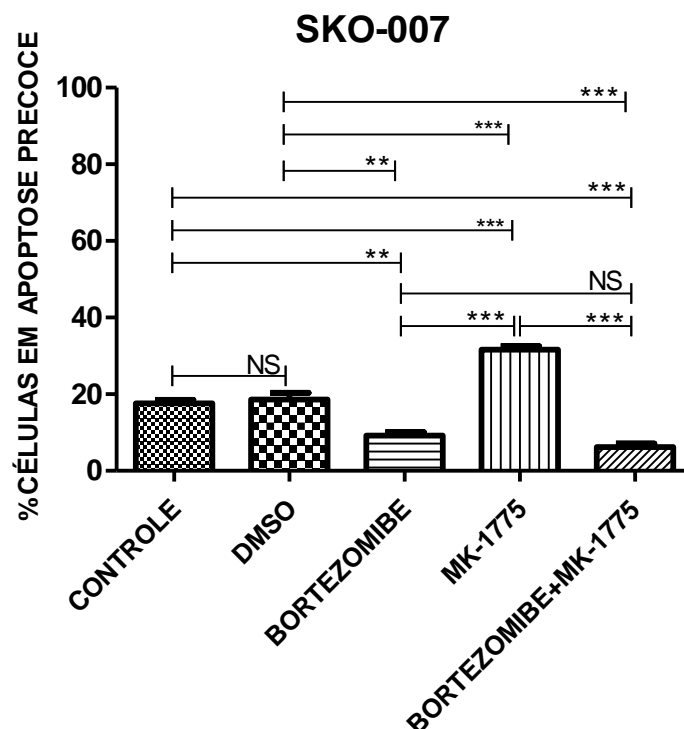


Figura 23. Porcentagem de células em apoptose precoce na linhagem SKO-007 antes e após o uso de bortezomibe e MK-1775. Eixo Y: porcentagem de células marcadas com anexina V; Eixo X: tratamentos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

Para as três linhagens, celulares houve diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas apenas com um tipo de fármaco (bortezomibe ou MK-1775) e as células que foram tratadas com a combinação dos fármacos. Apenas na linhagem SKO-007 não houve diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas com bortezomibe em relação as células tratadas com os fármacos combinados (bortezomibe e MK-1775). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com DMSO.

Para avaliar a apoptose tardia, analisamos apenas as células presentes no quadrante superior direito, marcadas com Anexina V e PI (Figura 24).

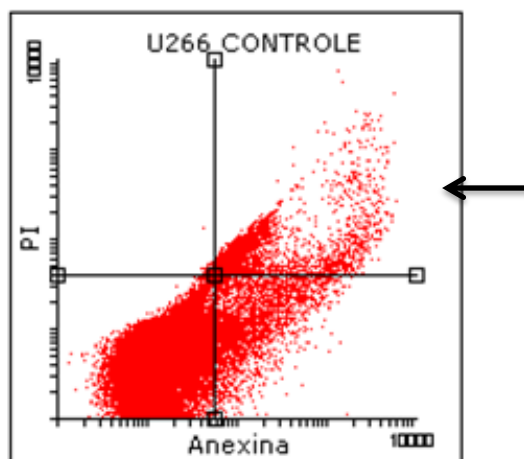


Figura 24. Citometria de fluxo para a linhagem U266, plaqueada sem a adição de fármacos (controle) e analisada 72 horas após o plaqueamento. Porcentagem de células em apoptose tardia dispostas no quadrante superior direito.

A linhagem RPMI-8226 apresentou média de triplicatas de 4,2%, 4,3%, 45,8%, 26,4% e 38,3% de apoptose tardia nas células não-tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação dos fármacos, respectivamente (Figura 25).

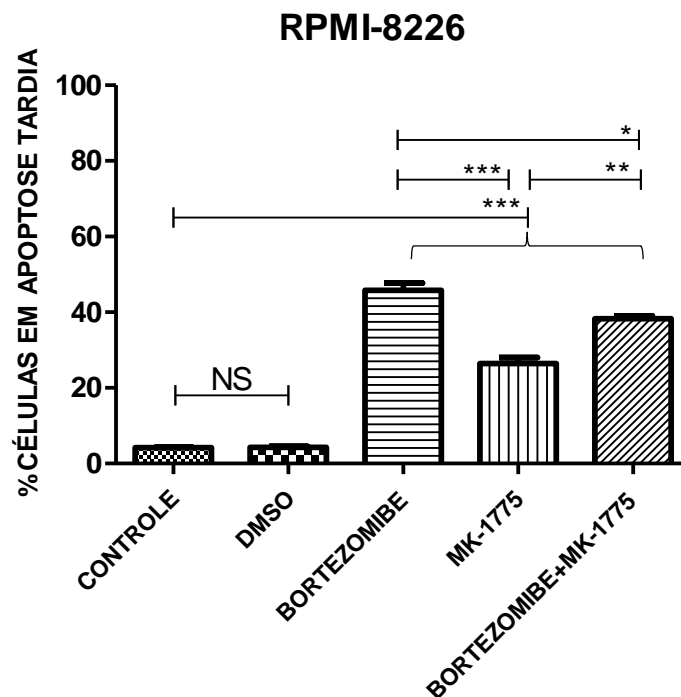


Figura 25. Porcentagem de células em apoptose tardia na linhagem RPMI-8226 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

A linhagem U266 apresentou média de triplicatas de 6,3%, 6,6%, 72,4%, 31,8% e 54,2% de apoptose tardia nas células não tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação dos fármacos, respectivamente (Figura 26).

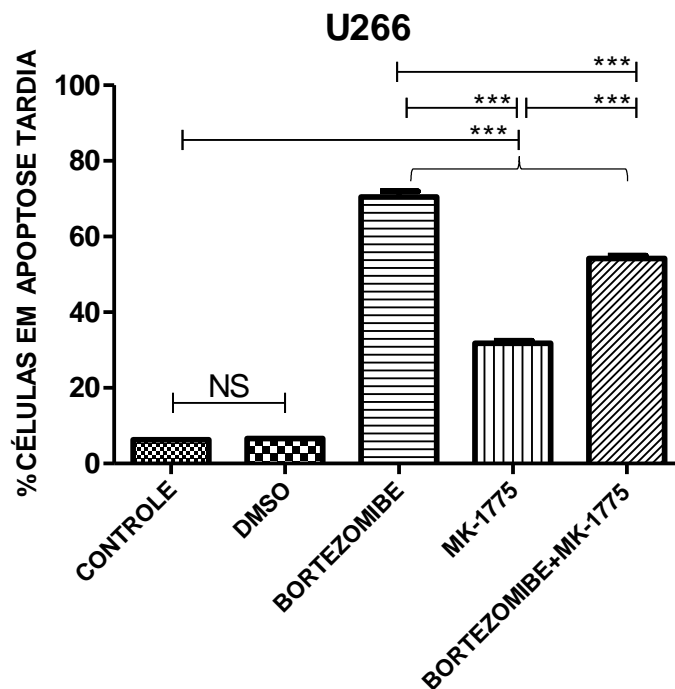


Figura 26. Porcentagem de células em apoptose tardia na linhagem U266 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

A linhagem SKO-007 apresentou média de triplicatas de 6,7%, 9,1%, 21,6%, 16,46% e 53,9% de apoptose tardia nas células não-tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação dos fármacos, respectivamente (Figura 27).

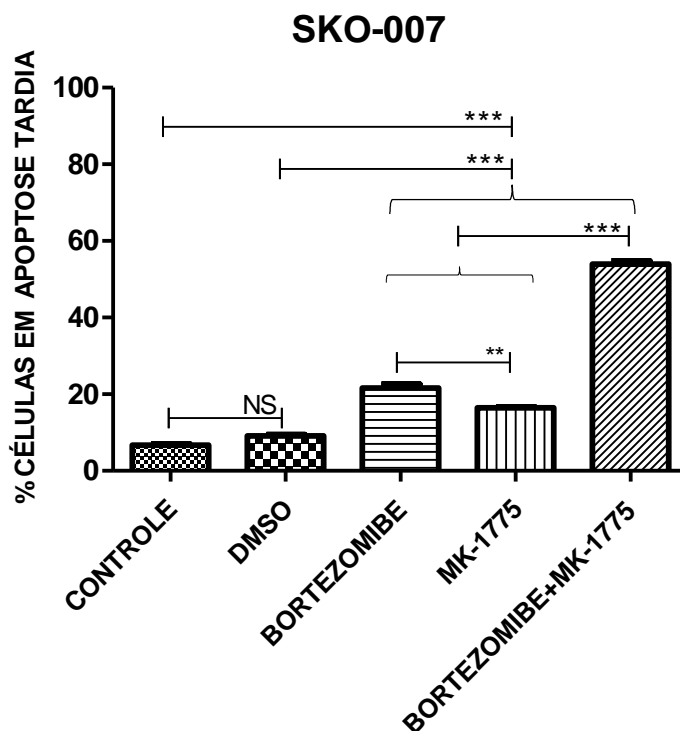


Figura 27. Porcentagem de células em apoptose tardia na linhagem SKO-007 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. **p <0.01; *** p <0.001; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

Nas linhagens RPMI-8226 e U266, a combinação de fármacos não foi superior ao uso isolado do bortezomibe em termos de capacidade de induzir apoptose tardia. Para a SKO-007, entretanto, a combinação de fármacos mais do que dobrou a porcentagem de células em apoptose tardia, em relação ao uso do bortezomibe isolado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com DMSO.

Para avaliar a porcentagem total de células em apoptose precoce e tardia (apoptose total), analisamos as células presentes nos quadrantes superior e inferior direito, onde as células foram marcadas com Anexina V e PI (Figura 28).

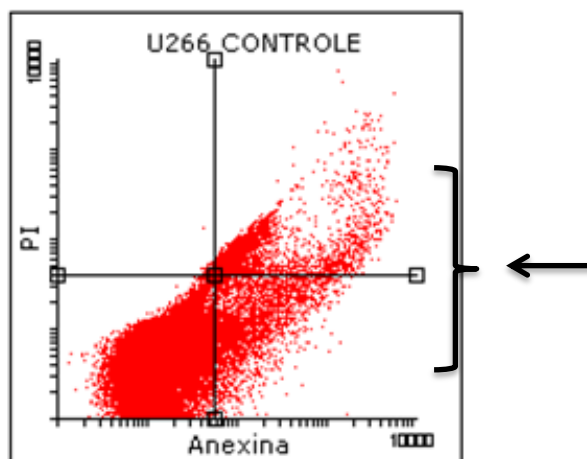


Figura 28. Citometria de fluxo para a linhagem U266, plaqueada sem a adição de fármacos (controle) e analisada 72 horas após o plaqueamento. Porcentagem de células em apoptose total dispostas nos quadrantes superior e inferior direito.

A linhagem RPMI-8226 apresentou média de triplicatas de 6,9%, 7,8%, 74,1%, 58,9% e 88,8% de apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) nas células não-tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação dos fármacos, respectivamente (Figura 29). Ou seja, nessa linhagem, a combinação de fármacos foi capaz de induzir a morte de quase 90% das células, diante de aproximadamente 75% de apoptose total quando tratada com bortezomibe.

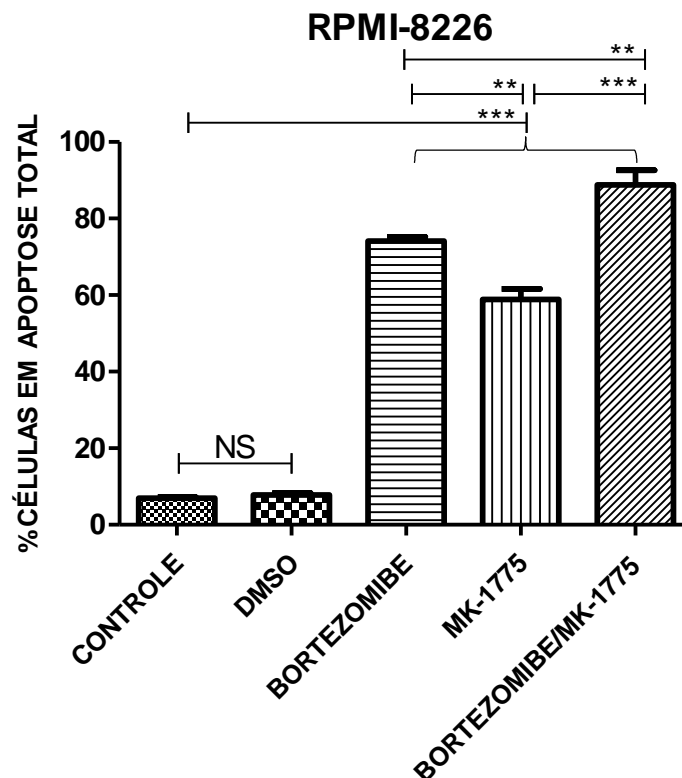


Figura 29. Porcentagem de células em apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) na linhagem RPMI-8226 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

A linhagem U266 apresentou média de triplicatas de 13,0%, 14,1%, 86,6%, 55,1% e 92,5% de apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) nas células não-tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação dos fármacos, respectivamente (Figura 30). Em relação à linhagem RPMI-8226, a porcentagem de células em apoptose após tratamento com a combinação de fármacos em relação ao uso isolado de bortezomibe não foi tão relevante, mas ainda assim foi estatisticamente significativa.

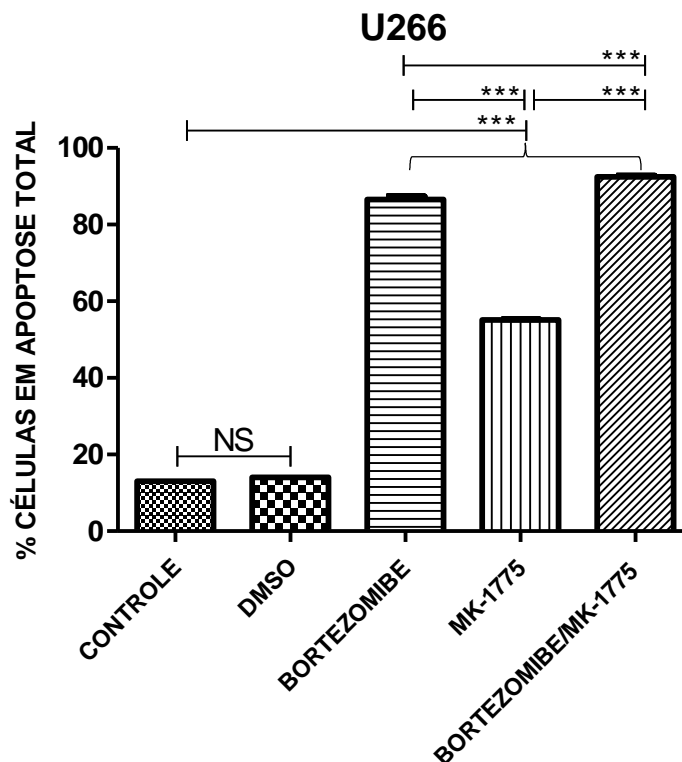


Figura 30. Porcentagem de células em apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) na linhagem U266 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

A linhagem SKO-007 apresentou média de triplicatas de 24,4%, 27,8%, 30,9%, 48,1% e 60,2% de apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) nas células não- tratadas, tratadas com DMSO, tratadas apenas com bortezomibe, tratadas apenas com MK-1775 e tratadas com a combinação das fármacos, respectivamente (Figura 31). A linhagem SKO-007 foi a que apresentou maior impacto da combinação de fármacos sobre a apoptose total, praticamente duplicando a morte celular em relação ao uso isolado de bortezomibe.

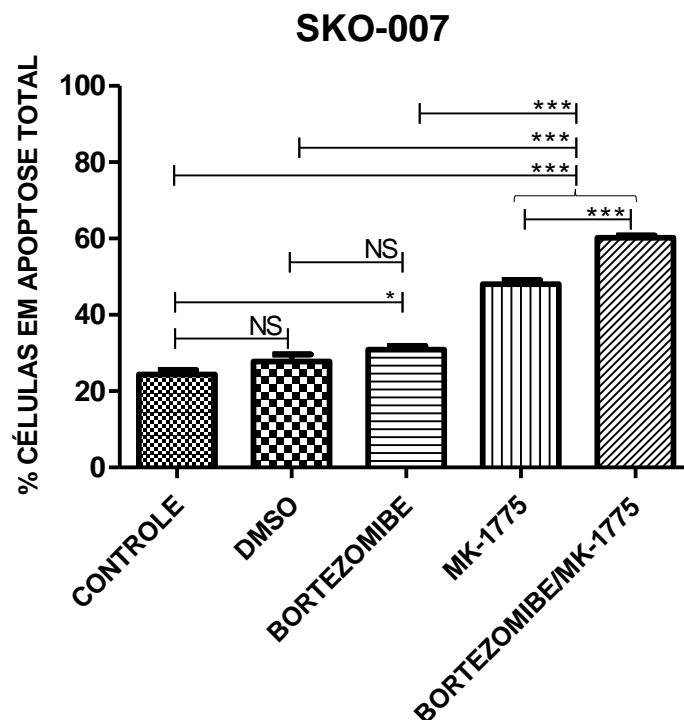


Figura 31. Porcentagem de células em apoptose total (apoptose precoce e apoptose tardia) na linhagem U266 antes e após o uso de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos fármacos. * $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: estatisticamente insignificante. Teste estatístico: One way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Teste realizado em triplicata.

4.6 Análise do efeito dos fármacos sobre o ciclo celular

Após tratamento com bortezomibe por 48 horas e MK-1775 por 6, 12 e 24 horas, as células da linhagem RPMI-8226 foram marcadas com iodeto de propídeo e o ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo.

Houve aumento na porcentagem de células da linhagem celular RPMI-8226 presentes nas fases SubG0/G1 e G2/M e aumento dos debris (células apoptóticas) após tratamento sequencial nos períodos de tempo 6 e 12 horas de incubação em comparação ao grupo controle (Figura 32. A, B, C e D). Não foi possível fazer a análise do ciclo celular após incubação com MK-1775 por 24 horas devido ao grande número de células em apoptose (Figura 32.E).

Ciclo celular (RPMI-8226)

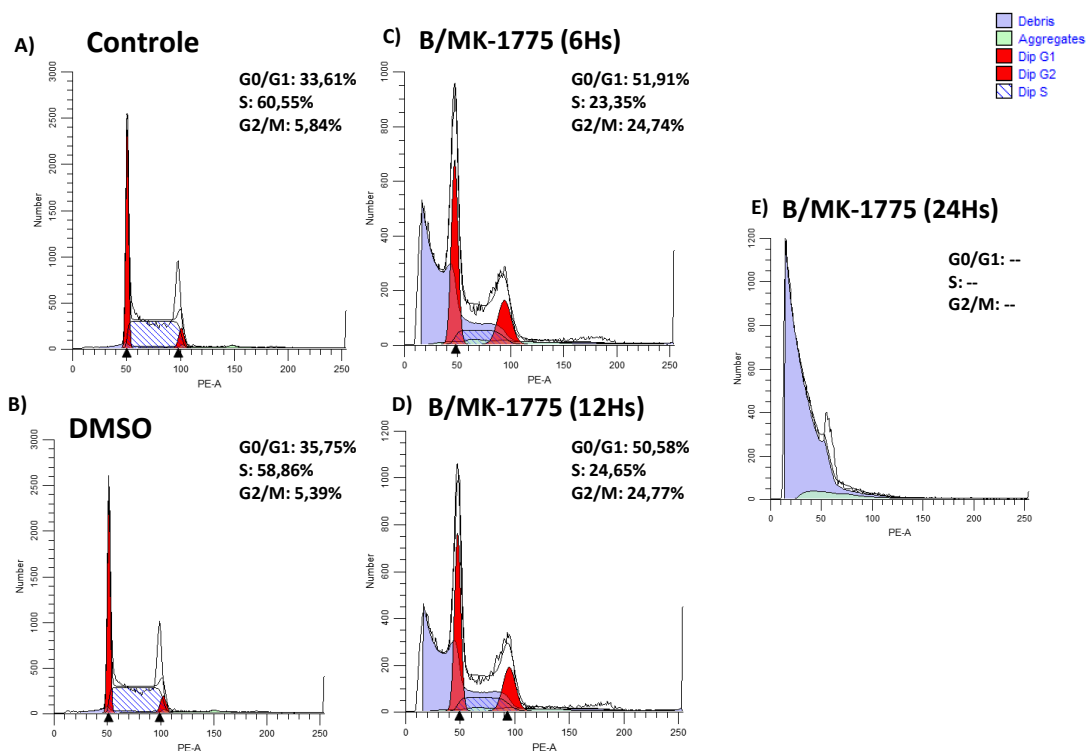


Figura 32. Distribuição de células RPMI-8226 em diferentes estágios do ciclo celular antes e após o tratamento com bortezomibe por 48 horas, seguido de MK-1775 por 6, 12 e 24 horas. Teste realizado em triplicata. Eixo Y: porcentagem de células. Eixo X: fases do ciclo celular. As células com tipo selvagem (WT) e DMSO mostraram a mesma distribuição das fases do ciclo celular. O bortezomibe (48 horas) seguido da incubação MK-1775 (6 ou 12 horas) mostrou aumento no subG0 / G1, diminuição na fase S e aumento na porcentagem de células da fase G2 / M.

5. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse estudo foi possível demonstrar que o inibidor de WEE1, MK-1775, promove apoptose celular significativa em linhagens celulares de MM, inclusive quando administrado isoladamente, sendo essa proteína um potencial alvo terapêutico a ser melhor estudada com o objetivo de proporcionar um tratamento mais efetivo para pacientes que apresentam recidivas da doença após tratamento com outras fármacos.

Muitos pesquisadores demonstraram a presença de células iniciadoras de tumor através do conhecimento das propriedades de células-tronco normais, tais como resistência a fármacos (Al-Hajj *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2007), que parecem contribuir para a recaída da doença (Hamburger & Salmon, 1977; Dean *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2006). Apesar da divergência na literatura sobre o possível fenótipo das MM-CSCs (Matsui *et al.*, 2004; Boucher *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012; Hosen, 2013), os experimentos realizados por nosso grupo sugerem, com base em marcadores estudados por Boucher *et al.* (2013), que a população de células CD 138-, CD19+, CD34+, ALDH1+ pode, de fato, corresponder às células resistentes à terapia e responsáveis pela recidiva do MM.

De acordo com Boucher *et al.* (2013), o perfil imunofenotípico de MM-CSCs seria CD138-/CD19+/CD34+/ALDH+. No entanto, nossos resultados demonstraram que as linhagens celulares RPMI-8226, U266 e SKO-007 não expressam CD19, diferentemente das células primárias dos pacientes com MM, e esse achado foi comprovado, após revisão da literatura, para as linhagens RPMI-8226 e U266 (Gooding *et al.*, 1999; Paíno *et al.*, 2012).

As quatro linhagens celulares de MM expressam *WEE1*, favorecendo a continuidade do estudo com o inibidor desse gene, MK-1775. Devido às

dificuldades no crescimento celular em cultura, não conseguimos realizar os experimentos funcionais com a linhagem SKM-M2.

A fim de investigar a importância do gene *WEE1* na fisiopatologia do MM, tratamos as linhagens celulares RPMI-8226, U266 e SKO-007 com diferentes concentrações do inibidor WEE1 (MK-1775) e incubamos por 24, 48 e 72 horas. Após o período de incubação, realizamos o teste de viabilidade celular utilizando o *Prestoblue* (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). Após 24 horas de tratamento com MK-1775, as linhagens celulares RPMI-8226 e U266 apresentaram aproximadamente 50% de morte celular nas concentrações de 5 μ M e 20 μ M, respectivamente. Para a linhagem SKO-007 após tratamento com MK-1775 durante 24 horas não alcançamos 50% de morte celular em nenhuma das concentrações testadas. Diante disso, optamos por aumentar o período de incubação do fármaco para 48 horas, supondo que para essa linhagem o efeito do fármaco poderia ser tempo-dependente (e não apenas dose-dependente como as linhagens U266 e RPMI-8226), demonstrando tratar-se de uma linhagem celular mais resistente à terapia.

Em um estudo com linhagens celulares de câncer ovariano a média do IC50 para as linhagens ID8 e SKOV3 foi 0,75 e 0,43 μ M, respectivamente, demonstrando a sensibilidade dessas linhagens frente ao tratamento com o MK-1775 isoladamente.

As principais características funcionais das CSCs são 1) a autorrenovação, 2) a iniciação do tumor e 3) o potencial de repopulação do tumor (Cojoc *et al.*, 2015).

Como não conseguimos promover o crescimento de MM-CSCs isoladas das linhagens celulares em cultura convencional (potencial de repopulação do

tumor), utilizamos outra estratégia. Já havíamos provado que as linhagens de MM RPMI-8226, U266 e SKO-007 apresentavam uma subpopulação CD138-, CD34+, ALDH1+. Teríamos a opção de avaliar a formação de esferas em *agar* como teste funcional da presença dessa população de CSCs nas linhagens celulares. A cultura celular em *soft agar* é uma alternativa para demonstrar a capacidade de autorrenovação celular já que esse é um método que facilita a interação entre as células e a formação das microesferas (Bao *et al.*, 2013; Horibata *et al.*, 2015).

Como a tentativa foi bem-sucedida, realizamos os testes com fármacos para avaliar a capacidade de bortezomibe, MK-1775 e a combinação dos dois fármacos de inibirem a formação das esferas. A terapia combinada com bortezomibe e MK-1775 aboliu a formação de microesferas em *soft ágar* nas linhagens RPMI-8226 (também responsiva ao uso isolado dos fármacos) e U266, mas a linhagem SKO-007 foi resistente a todos os fármacos, isolados e combinados. Devemos lembrar que por questões técnicas, não houve sensibilização prévia das linhagens com bortezomibe e posterior incubação com MK-1775 (os dois fármacos foram adicionados simultaneamente na camada intermediária do gel). A incubação sequencial com bortezomibe seguida de MK-1775 foi realizada nos testes de apoptose celular, como discutiremos a seguir, com resultados bastante interessantes, principalmente para SKO-007, sugerindo que essa estratégia pode ser mais eficiente do que o uso dos fármacos simultaneamente.

A apoptose é o fenômeno de morte celular programada que possui papel essencial na manutenção da homeostase. Durante a apoptose, os resíduos de fosfatidilserina (PS) presentes no interior da membrana celular, se

exteriorizam (Blagosklonny, 2000). Essa alteração pode ser detectada usando a marcação citoplasmática com Anexina V (que se liga ao resíduo PS) e, através da citometria de fluxo, é possível quantificar o número de células apoptóticas em uma cultura. Ao usar este método para quantificar células apoptóticas, o ideal é adicionar iodeto de propídeo (PI) para distinguir células apoptóticas com a membrana plasmática intacta das células com ruptura na membrana e que estão em estágio de necrose (Darzynkiewicz & Bedner, 2001).

No presente estudo, após tratamento combinado com bortezomibe e MK-1775, houve aumento na porcentagem de morte celular (apoptose total) em todas as linhagens celulares em comparação ao uso isolado dos mesmos fármacos. Na linhagem RPMI-8226, a combinação de fármacos foi capaz de induzir a morte de quase 90% das células, diante de aproximadamente 75% de apoptose total quando tratada com bortezomibe, fármaco considerado um dos pilares da terapia de indução do MM (mas sempre utilizada em combinação com outros fármacos). A porcentagem de células em apoptose total na linhagem U266 após tratamento com a combinação de fármacos em relação ao uso isolado de bortezomibe não foi tão relevante (92,5% vs 86,6%), mas ainda assim foi estatisticamente significativa. Por fim, a linhagem SKO-007 foi a que apresentou maior impacto da combinação de fármacos sobre a apoptose total, praticamente duplicando a morte celular em relação ao uso isolado de bortezomibe (60,2% vs 30,9%). Na terapia combinada, as células tiveram maior tempo de exposição ao bortezomibe (mais 24 ou 48 horas) quando comparadas à monoterapia (48 horas). Portanto, podemos questionar se o efeito observado se deve à combinação das drogas ou ao tempo prolongado de exposição ao bortezomibe. No entanto, do ponto de vista clínico, o bortezomibe não se

mostrou eficaz em monoterapia, estando sempre associado a 3 ou 4 outros fármacos para aumentar as chances de remissão completa na terapia de indução (www.clinicaltrials.gov).

Devemos lembrar que estudo anterior de nosso grupo, associado a informações da literatura, demonstrou que: 1) a linhagem RPMI-8226 não apresenta deleção de 17p, mas existe mutação em um dos alelos do *TP53*; 2) a linhagem U266 apresenta deleção de um alelo e mutação do outro alelo *TP53* (del 17p) e que 3) SKO-007, derivada da U266, também apresenta deleção do 17p (Fernando *et al.*, 2015; www.keatslab.org).

Em estudo com linhagens celulares de linfoma de células do manto, a combinação dos inibidores de WEE1 (MK-1775) e CHK1 (PF-00477736) apresentou um forte sinergismo gerando um valor seis vezes maior de morte celular quando comparado com o tratamento isolado com cada uma das fármacos (Chilá *et al.*, 2014).

Em estudo com linhagens celulares de câncer ovariano a ação citotóxica do MK-1775 como um agente quimioterápico único foi independente do *status* do gene *TP53* (Zhang *et al.*, 2017), assim como em estudo realizado com linhagens celulares de sarcoma (Kreahling, 2013), sugerindo que o efeito da inibição de WEE1 possa se sobrepor ao efeito deletério da mutação/deleção de *TP53*, e auxiliar na indução de apoptose.

Em um estudo com células endoteliais vasculares após tratamento com diferentes doses de bortezomibe, foi observado aumento acentuado no *status* de fosforilação dos resíduos T14, Y15 e T161 na CDC2 de maneira dose-dependente, sugerindo que o bortezomibe participou na geração da forma inativa do complexo CDC2/ciclina B; além disso, observaram aumento da expressão e

dos níveis de fosforilação de WEE1 e aumento da ubiquitinação das proteínas WEE1 e ciclina B de maneira dose-dependente, sugerindo que o bortezomibe possa estar parcialmente envolvido na inibição da fase G2/M do ciclo celular (Tamura *et al.*, 2010). Esses dados sugerem o possível sinergismo entre bortezomibe e MK-1775 no ciclo celular, impedindo o reparo do DNA na fase G2/M.

Estudos em câncer de ovário, mama, próstata, pâncreas e cólon mostraram que o MK-1775 possui efeito sinérgico quando combinado com agentes que causam dano ao DNA (Hirai *et al.*, 2010; Bridges *et al.*, 2011; Rajeshkumar *et al.*, 2011). Mais recentemente, um estudo japonês demonstrou que o uso do MK-1775 como agente único inibiu a proliferação de células MM do tipo selvagem sensíveis ao bortezomibe e células MM resistentes ao bortezomibe, sugerindo que a resistência a essa fármaco pode ser superada com inibidores de WEE1. Essa descoberta apóia os bons resultados de nosso tratamento seqüencial, conforme descrito na Figura 33.

Assim, nesse estudo, optamos por utilizar o esquema de tratamento sequencial com bortezomibe seguido por MK-1775 com o intuito de que: 1) o primeiro fármaco, amplamente utilizada em pacientes com MM, provoque uma desestabilização celular, devido ao seu principal mecanismo de ação que é a inibição do proteassoma, gerando um acúmulo de proteínas no interior celular; 2) em seguida o segundo fármaco, que atua no ciclo celular, bloquearia a parada no checkpoint G2/M, direcionando a célula a uma mitose precoce e consequente apoptose; sem esquecer do já citado 3) sinergismo dos fármacos impedindo o reparo do DNA na fase G2/M.

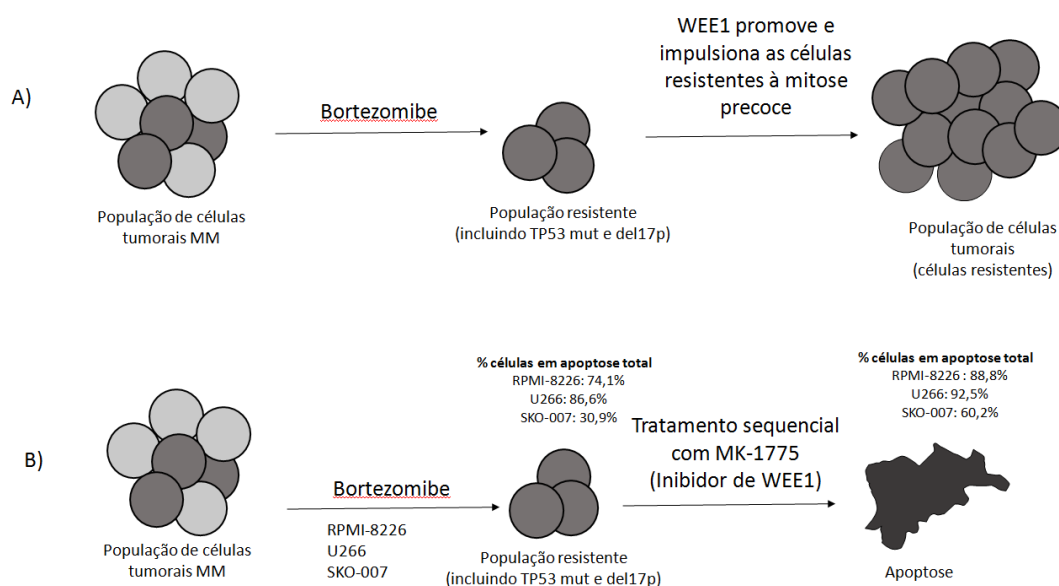


Figura 33. Esquema do mecanismo de ação de bortezomibe associado ao MK-1175 (inibidor de WEE1) em linhagens celulares de MM, incluindo a população resistente (TP53mut e del17p).

Após a análise do ciclo celular na linhagem RPMI-8226, observamos aumento da população celular nas fases SubG0/G1 e G2/M e aumento dos debris (células apoptóticas) com o tratamento sequencial (bortezomibe/MK-1775) comparado aos controles. Um estudo envolvendo linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda evidenciou aumento do número de células na fase G2/M e S do ciclo celular após tratamento com MK-1775 nas concentrações de 100 e 300 nM, independente da presença ou não de mutação no gene *TP53* (Duan *et al.*, 2018). A combinação de MK-1775 com doxorubicina induziu maiores taxas de apoptose celular em relação aos mesmos agentes isolados.

Muitos pesquisadores estão buscando outras vias para alcançar um melhor tratamento aos pacientes com MM, tais como inibidores da histona desacetilase e anticorpos monoclonais (Murray *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2012; Nijhof *et al.*, 2015). Até o momento, não há estudos que utilizaram inibidores de WEE1 clinicamente em MM; no entanto, o fármaco vem sendo

utilizada no tratamento de tumores sólidos (www.clinicaltrials.gov) e em outras linhagens celulares de tumores hematológicos (Hirai *et al.*, 2010; Brooks *et al.*, 2011).

Como na terapia combinada/sequencial, as células foram expostas a um tempo de exposição maior ao bortezomibe (48hs mais 24 ou 48hs) comparada a monoterapia (48hs), questiona-se se o efeito observado se deve apenas a combinação das drogas ou ao tempo prolongado de exposição ao bortezomibe.

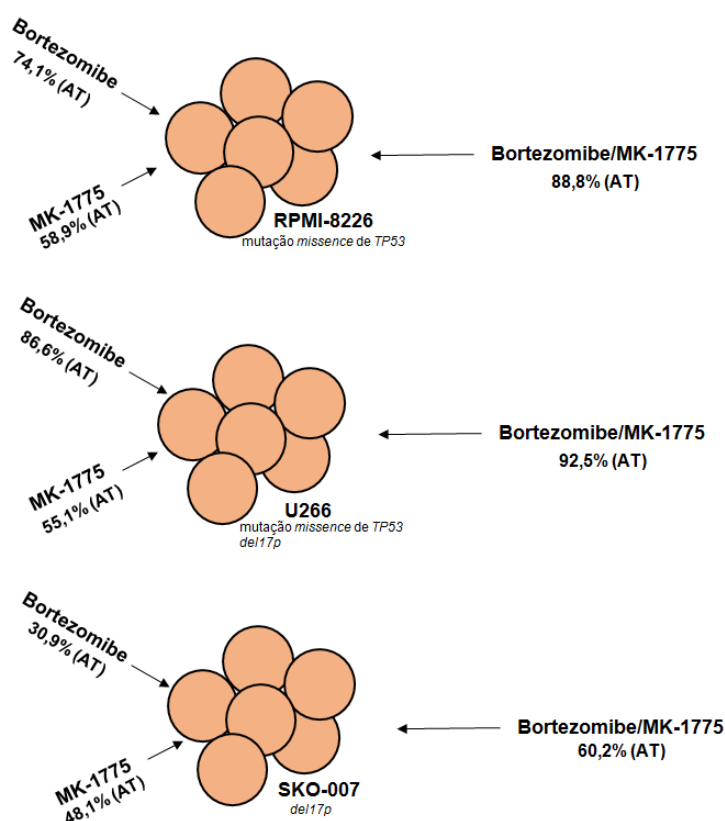


Figura 34. Resumo dos resultados obtidos de apoptose total (AT) das linhagens celulares de MM após tratamento com os fármacos isolados e tratamento sequencial (bortezomibe/MK-1775).

Em resumo, nossos resultados demonstraram que, após o tratamento sequencial com o bortezomibe e MK-1775, houve aumento na porcentagem de morte celular em todas as linhagens, em comparação ao uso das mesmas fármacos isoladamente (Figura 34). No entanto, a linhagem celular SKO-007, com perfil altamente resistente ao bortezomibe como agente único, apresentou maior impacto na apoptose total quando tratado com a combinação das fármacos. Assim, a indução de apoptose total em mais de 85% das células da linhagem U266 e em 60% das células da linhagem SKO-007 com a combinação de bortezomibe e MK-1775 demonstram a potencial importância dessa estratégia para pacientes que apresentam MM e del17p ou mutação de *TP53* (alto risco).

Após envio dos dados à publicação, estes foram disponibilizados à Astra-Zeneca, detentora dos direitos sobre o uso comercial do MK-1775, através do escritório brasileiro da empresa. Estudos clínicos em andamento fornecerão resultados sobre segurança e eficácia deste fármaco em pacientes portadores de outros tumores para então iniciarmos alguma parceria em relação ao MM (uso clínico em portadores de del17 ou mutação de *TP53*).

6. CONCLUSÕES

Realizamos estudos funcionais para verificar o efeito da inibição de *WEE1* em linhagens celulares de MM e seu potencial como alvo-terapêutico.

- 1) Identificamos, em três linhagens celulares de MM, a presença das possíveis MM-CSCs (CD138-/CD34+/ALDH1+) através de *sorting* por citometria de fluxo. Verificamos que as linhagens celulares não expressam CD19, diferentemente das MM-CSCs, obtidas das amostras de pacientes com MM.
- 2) Confirmamos a expressão do gene *WEE1* nas linhagens celulares de MM, o que nos permitiu utilizá-las como modelo para estudos funcionais de inibição de *WEE1*.
- 3) Avaliamos a viabilidade das linhagens celulares de MM, antes e após o tratamento com inibidor de *WEE1* (MK-1775) e em combinação com inibidor de proteassoma (bortezomibe), para estabelecer a dose a ser utilizada nos ensaios funcionais (pelo menos 50% de redução na viabilidade celular).
- 4) Avaliamos o efeito do inibidor de *WEE1* (MK-1775), isolado ou em combinação com inibidor de proteassoma (bortezomibe), na formação de microesferas, no ciclo celular e na indução de apoptose. A terapia combinada com bortezomibe e MK-1775 aboliu a formação de microesferas em *soft ágar* nas linhagens RPMI-8226 (também responsiva ao uso isolado dos fármacos) e U266, mas a linhagem SKO-007 foi resistente a todas os fármacos, isoladas e combinadas. Houve aumento na porcentagem de células da linhagem celular RPMI-8226 presentes nas fases G0/G1 e G2/M e aumento dos debris (células apoptóticas) após tratamento sequencial nos períodos de tempo 6 e 12 horas de incubação

em comparação ao grupo controle O tratamento sequencial das linhagens com bortezomibe seguido de MK-1775 *versus* uso isolado de bortezomibe demonstrou impacto significativo na indução da apoptose total: 88,8% vs 74,1% na RPMI-822; 92,5% vs 86,6% na U266; e, 60,2% vs 30,9% na SKO-007.

7. REFERÊNCIAS

AARTS M, *et al.* Forced Mitotic Entry of S-Phase Cells as a Therapeutic Strategy Induced by Inhibition of WEE1. *Cancer Discovery*. 2012;2(6):524-39.

ABE M, HARADA T, MATSUMOTO T. Concise review: Defining and targeting myeloma stem cell-like cells. *Stem Cells*. 2014;(32)1067-73.

AL-HAJJ M, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(7):3983-8.

American Cancer Society [Internet]. Disponível em: <https://www.cancer.org/>. Acesso em 15/08/2018.

BAO B, *et al.* Cancer Stem Cells (CSCs) and Mechanisms of Their Regulation: Implications for Cancer Therapy. *Curr Protoc Pharmacol*. 2013; 14-25.

BERGSAGEL P L, KUEHL W M. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001; 20:5611–5622.

BLAGOSKLONNY M V. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia*. 2000; 14:1502–1508.

BOUCHER K, *et al.* Stemness of B-cell Progenitors in Multiple Myeloma Bone Marrow. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(22):6155-68.

BRENNER H, GONDONS A, PULTE D. Recent major improvement in long-term survival of young patients with multiple myeloma. *Blood*. 2008;111:2521-6.

BRIDGES K, *et al.* MK-1775, a novel Wee1 kinase inhibitor, radiosensitizes p53-defective human tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:5638–5648.

BROOKS D, *et al.* MK-1775, a potent Wee1 inhibitor, synergizes with gemcitabine to achieve tumor regressions, selectively in p53-deficient pancreatic cancer xenografts. *Clinical Cancer Res*. 2011; 17: 2799-2806.

BUCHER N, BRITTEN CD. G3 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer*. 2008; 98:523-528.

CHILÁ R, *et al*. Combined inhibition of Chk1 and Wee1 as a new therapeutic strategy for mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. 2014; 6(5):3394-3408.

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/>. Acesso em: 05 de março de 2019.

COJOC M, *et al*. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol*. 2015; 31:16-27.

DARZYNKIEWICZ Z, LI X, BEDNER E. Use of flow and laser-scanning cytometry in analysis of cell death. *Methods Cell Biol*. 2001; 66:69–109.

DE WITT H P, *et al*. WEE1 Kinase Targeting Combined with DNA-Damaging Cancer Therapy Catalyzes Mitotic Catastrophe. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(13):4200-7.

DEAN M, FOJO T, BATES S. Tumor stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5(4):275-84.

DI RORA A G L, *et al*. The Wee1 Inhibitor, MK-1775, Sensitizes Leukemic Cells to Different Antineoplastic Drugs Interfering with DNA Damage Response Pathway. *Blood* 2015; 126:1276;

DIMOPOULOS M A, *et al*. Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2018; 379:1811-1822.

DISPENZIERI A, *et al*. International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009; 23: 215-24.

DIXON H, NORBURY C J. Therapeutic exploitation of checkpoint defects in cancer cells lacking p53 function. *Cell Cycle* 2002;1:362–8.

DO K, DOROSHOW J H, KUMMAR S. Wee1 kinase as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*. 2013;12(19):3348-53.

DO K, *et al.* Phase I Study of Single-Agent AZD1775 (MK-1775), a Wee1 Kinase Inhibitor, in Patients With Refractory Solid Tumors. *J Clin Oncol*. 2015; 33(30):3409-15.

DURIE B G M, SALMON S E. A Clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer*. 1975; 36:842-854.

DUAN Y, *et al.* Wee1 kinase inhibitor MK-1775 induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells and enhances the efficacy of doxorubicin involving downregulation of Notch pathway *J ONCOLOGY LETTERS*. 2018; 16: 5473-5481.

ENGELHARDT M *et al.* European Myeloma Network Recommendations On The Evaluation And Treatment Of Newly Diagnosed Patients With Multiple Myeloma. *Haematologica*. 2014; 99: 232-242;

FERNANDO R C, *et al.* Multiple myeloma cell lines and primary tumors proteoma: protein biosynthesis and immune system as potential therapeutic targets. *Genes Cancer*. 2015; 6(11-12):462-471.

GHOBRUEL I M, LANDGREN O. How I treat smoldering multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123(23):3380-88.

GO R S, RAJKUMAR V. How I manage monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2018; 131 (2): 163-173.

GOODING R *et al.* Phenotypic and molecular analysis of six human cell lines derived from patients with plasma cells dyscrasia. *Br J Haematol.* 1999; 106(3):669-81.

GREIPP P R, *et al.* International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005; 23:3412-3420.

HAJEK R, OKUBOTE S, SVACHOVA H. Myeloma stem cell concepts, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma. *British Journal of Haematology.* 2013; 163:551-64.

HAMBURGER A, SALMON S. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science.* 1977;197:461–3.

HARRIS P, *et al.* Integrated genomic analysis identifies the mitotic checkpoint kinase WEE1 as a novel therapeutic target in medulloblastoma. *Molecular Cancer.* 2014;13(1):72.

HIRAI, H, *et al.* MK-1775, a small molecule Wee1 inhibitor, enhances anti-tumor efficacy of various DNA-damaging agents, including 5-fluorouracil. *Cancer Biol Ther.* 2010;9: 514-522.

HORIBATA S, *et al.* Utilization of the soft agar colony formation assay to identify inhibitors of tumorigenicity in breast cancer cells. *Journal of Visualized experiments.* 2015.

HOSEN N. Multiple Myeloma-initiating cells. *International Journal of Hematology.* 2013; 97(3):306-312.

HUFF C A, *et al.* The paradox of response and survival in cancer therapeutic. *Blood.* 2006;107(2):431-4.

HUNGRIA V T M, *et al.* New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2019; 41(1): 76–83.

INTERNATIONAL MYELOMA WORKING GROUP. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol.* 2003;121(5):749-57.

IORNS E, *et al.* Integrated Functional, Gene Expression and Genomic Analysis for the Identification of Cancer Targets. *Plos One.* 2009;4(4): e5120.

ISHIGURO T, *et al.* Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* 2017; 108(3):283-289.

JAKAB S, *et al.* New treatment Methods in Multiple Myeloma. 2017; 2(2):144-149.

KASTAN M B, BARTEK J. Cell-cycle checkpoint and cancer. *Nature.* 2004; 432:316-323.

Keatslab.org [Internet]. Disponível em: <http://www.keatslab.org/myeloma-cell-lines/>. Acesso em 05/11/2018.

KIM D, *et al.* CD19(-) CD45(low/-) CD38(high)/CD138(+) plasma cells enrich for human tumorigenic myeloma cells. *Leukemia.* 2012; 26(12):2530–7.

KOGISO T, *et al.* Efficient Induction of Apoptosis by Wee1 Kinase Inhibition in Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLoS ONE.* 2014; 9(6):e100495.

KREHLING J M, *et al.* MK1775, a Selective Wee1 Inhibitor, Shows Single-Agent Antitumor Activity against Sarcoma Cells. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2012; 11(1).

KREHLING J M, *et al.* Wee1 inhibition by MK-1775 leads to tumor inhibition and enhances efficacy of gemcitabine in human sarcomas. *Plos One.* 2013; 8(3):e57523.

KRISTINSSON S Y, *et al.* Patterns of Survival in Multiple Myeloma: A Population-Based Study of Patients Diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25(15):1993-9.

KUMAR S K, *et al.* Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2007;111(5):2516-20.

KUMAR S K, *et al.* Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*. 2012; 119 (9) 2100-2105.

KUMAR S K, *et al.* NCCN Guidelines[®] Insights Multiple Myeloma, Version 3.2018 Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018; 16(1):11–20.

KYLE R A, RAJKUMAR S V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009; 23(1):3-9.

KYLE R A, RAJKUMAR S V. Multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2004;351:1860-73.

LAGANÀ A, *et al.* Integrative network analysis identifies novel drivers of pathogenesis and progression in newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*. 2018;32(1):120-130.

MASAKI T, *et al.* Cyclins and cyclin-dependent kinases: comparative study of hepatocellular carcinoma versus cirrhosis. *Hepatology*. 2003;37:534–43.

MATSUI W, *et al.* Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004; 103:2332–6.

MATSUI W, *et al.* Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 2008; 68:190–7.

MIR S, *et al.* In Silico Analysis of Kinase Expression Identifies WEE1 as a Gatekeeper against Mitotic Catastrophe in Glioblastoma. *Cancer Cell*. 2010;18(3):244-57.

MYUNG J, KIM K B, C M. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev*. 2001;21(4):245-73.

MOREAU J P, *et al.* Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up., on behalf of the ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol*. 2017; 1,28(suppl_4): iv52-iv61.

MUELLER S, HAAS-KOGAN D A. WEE1 Kinase as a Target for Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(30):3485-7.

MURRAY M Y, AUGER M J, BOWLES K M. Overcoming bortezomib resistance in multiple myeloma. *Biochemical Society Transactions*. 2014; 42(4):804-8.

NIJHOF I S. *et al.* Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia*. 2015; 29(10):2039-49.

O'BRIEN C, *et al.* A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445:106-10.

OLIVEIRA M B, *et al.* Multiple Myeloma Cancer Stem Cells: Immunophenotypic and Functional Characterization, Gene Expression profiling and Therapeutic Targets. In: ASH 2016 ANNUAL MEETING, 58, 2016.

OLIVEIRA M B, *et al.* Anti-myeloma effects of ruxolitinib combined with bortezomib and lenalidomide: A rationale for JAK/STAT pathway inhibition in myeloma patients. *Cancer Lett*. 2017; 403:206-215.

PAÍNO T, *et al.* CD20 Positive cells are understectable in the majority of multiple myeloma cell lines and are not associated with a cancer stem cell phenotype. *Haematologica*. 2012; 97:1110-1114.

PALUMBO A, ANDERSON K. Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2011; 364:1046-60.

PALUMBO A, *et al.* Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From. International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015; 33(26):2863-2869.

POSTHUMADEBOER J, *et al.* WEE1 inhibition sensitizes osteosarcoma to radiotherapy. *BMC Cancer*. 2011;11:156.

RAJESHKUMAR N V. MK-1775, a potent Wee1 inhibitor, synergizes with gemcitabine to achieve tumor regressions, selectively in p53-deficient pancreatic cancer xenografts. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:2799–2806.

RAJKUMAR S V, *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15:e 538-48.

RAJKUMAR S V, KUMAR S K. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016; 91(1): 101–119.

RAJKUMAR S V. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014; 89(10):999-1009.

RICHARDSON P G, *et al.* A Phase 2 Study of Elotuzumab (Elo) in Combination with Lenalidomide and Low-Dose Dexamethasone (Ld) in Patients (pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (R/R MM): Updated Results. *Blood*. 2012;120(21):202.

RUNCIE K D, MARK Tomer M. Novel Induction Regimens in Multiple Myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2015;10(4):388-94.

SINGH S, *et al*. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432:396-401.

SONNEVELD P, *et al*. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016; 127:2955-2962.

STORMS R W, *et al*. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proceeding of National Academy of Science of USA* 1999; 96:9118-23.

TABAYASHI T Y, *et al*. Inhibition of WEE1 induces cell death of both bortezomib- and lenalidomide-resistant multiple myeloma cells: a novel therapeutic approach targeting cell-cycle checkpoint kinase. *Blood* 2016; 128:3256.

TAMURA D, *et al*. Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer Sci*, 2010; 101 (6):1403–1408.

TREPEL M, *et al*. Phenotypic detection of clonotypic B cells in multiple myeloma by specific immunoglobulin ligands reveals their rarity in multiple myeloma. *Plos One* 2012; 7: e31998.

XU N, *et al*. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is associated with a poor prognosis of bladder cancer. *Cancer Epidemiology*. 2015;39(3):375-81.

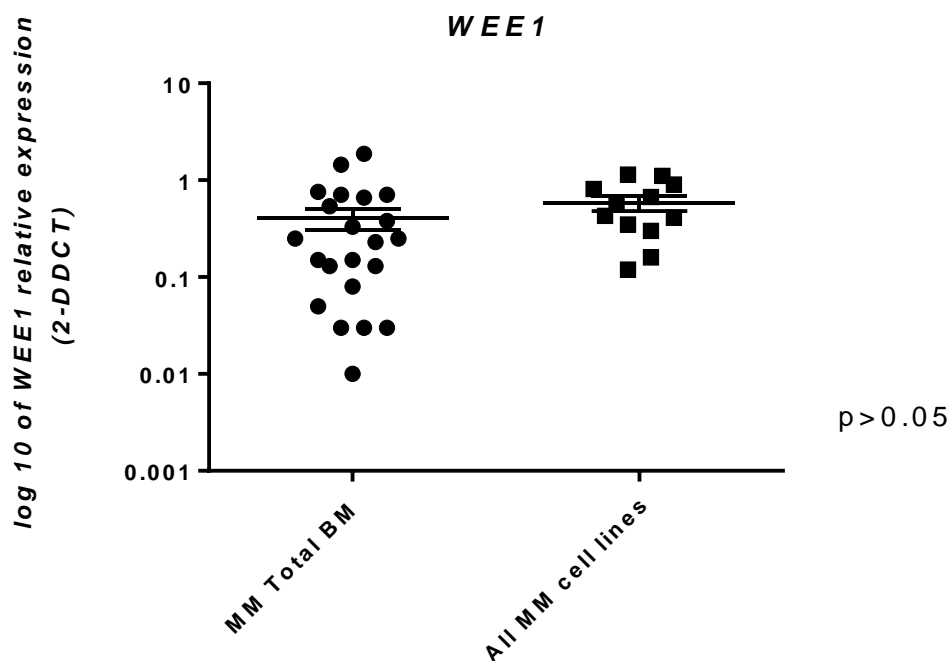
ZHANG M, *et al*. WEE1 inhibition by MK1775 as a single-agent therapy inhibits ovarian cancer viability. *Oncology Letters*. 2017; 14: 3580-3586.

ZHOU J, *et al.* Neurotensin signaling regulates stem-like traits of glioblastoma stem cells through activation of IL-8/CXCR1/STAT3 pathway. *Cellular Signalling*. 2014; 26(12):2896-2902.

ZHOU W, *et al.* ALDH1 activity identifies tumor-initiating cells and links to chromosomal instability signatures in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014; 28:1155–8.

Apêndice 1. Expressão relativa do gene *WEE1* em linhagens celulares de MM e amostras de medula óssea (BM) de pacientes com MM (n = 22).

O gene constitutivo *β-actina* (*ACTB*) foi utilizado como controle endógeno e a linhagem celular SKMM2, como referência. Os resultados foram expressos no log 10 da expressão relativa usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Teste t não pareado (mediana + - SEM).



Anexo1 – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 21 de novembro de 2017
CEP N° 8411220817

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Angela Isabel Pereira Eugênio

Depto/Disc: Departamento De Oncologia Clínica E Experimental/ Disciplina De Hematologia E Hemoterapia

Pesquisadores associados: Taís Guimarães (universidade Federal De São Paulo); Gisele Wally Braga Colleoni (orientador)

Título do projeto: " IMPORTÂNCIA DO GENE WEE1 E EFEITOS DA SUA INIBIÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS DE MIELOMA MÚLTIPLO ".

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

O estudo tem como objetivos: Identificar, em linhagens celulares de MM RPMI8226 e U266 a presença das possíveis MM-CSCs (CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+) através de sorting por citometria de fluxo; Avaliar a expressão do gene WEE1 nas linhagens selvagens de MM, antes e após inibidor de WEE1 (MK-1775); Avaliar a indução de apoptose nas linhagens celulares de MM, antes e após inibidor de WEE1 (MK-1775); De acordo com os resultados obtidos, possíveis caminhos incluem: tratamento dessas células in vitro com inibidor de WEE1 em combinação com inibidores de proteassoma e drogas imunomoduladoras; co-cultura de MM-CSCs com células estromais normais de MO; inocular as MM-CSCs em camundongos imunodeficientes para avaliar o desenvolvimento de plasmocitoma no flanco (modelo animal já estabelecido em nosso laboratório com linhagens celulares de MM).

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 27/08/2017, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

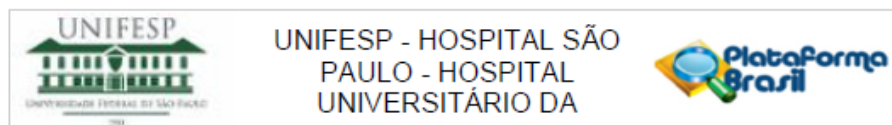
1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo 2- Parecer Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPORTÂNCIA DO GENE WEE1 E EFEITOS DA SUA INIBIÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS DO MIELOMA MÚLTIPLO

Pesquisador: REBECCA SILVEIRA SANTOS BARBOSA DANTAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 92331218.0.0000.5505

Instituição Proponente: Disciplinas de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Oncologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.755.552

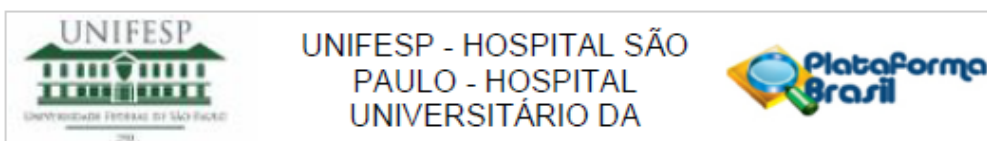
Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n: 0739/2018

IMPORTÂNCIA DO GENE WEE1 E EFEITOS DA SUA INIBIÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS DO MIELOMA MÚLTIPLO Os objetivos do estudo são: - Identificar, em linhagens celulares de MM, a presença das possíveis MM-CSCs (CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+) através de sorting por citometria de fluxo; - Avaliar a expressão do gene WEE1 nas linhagens selvagens de MM; - Avaliar a viabilidade das linhagens celulares de MM, antes e após o tratamento com inibidor de WEE1 (MK-1775) e em combinação com inibidor de proteassoma (bortezomibe) utilizando citometria de fluxo e método de cultura em soft agar para formação de microesferas; - Avaliar a viabilidade celular após co-cultura com células estromais normais tratadas com inibidor de WEE1 e em combinação com inibidor de proteassoma.

-HIPÓTESE: A proteína WEE1 é um modulador negativo da entrada da célula na mitose e a superexpressão de WEE1 tem sido observada em várias neoplasias, como carcinoma hepatocelular, câncer de mama e glioblastoma. A inibição de WEE1 por siRNAs, ou pequenas moléculas inibidoras da expressão do gene, impulsiona a célula para a mitose precoce levando-a à apoptose, característica que tem sido explorada como estratégia terapêutica em outros tumores. Ensaios pré-clínicos têm mostrado diminuição da viabilidade celular e da carga tumoral e melhora na sobrevivência após inibição de WEE1. O inibidor MK-1775 inibe a WEE1 kinase e atua competindo com ATP, evitando o reparo do DNA. Com isso, nossos resultados sugerem a molécula WEE1 como

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.755.552

possível alvo terapêutico que pode ser explorado no Mieloma Múltiplo.

Objetivo da Pesquisa:

Projeto CEP/UNIFESP n: 0739/2018

IMPORTÂNCIA DO GENE WEE1 E EFEITOS DA SUA INIBIÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS DO MIELOMA MÚLTIPLO Os objetivos do estudo são: - Identificar, em linhagens celulares de MM, a presença das possíveis MM-CSCs (CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+) através de sorting por citometria de fluxo; - Avaliar a expressão do gene WEE1 nas linhagens selvagens de MM; - Avaliar a viabilidade das linhagens celulares de MM, antes e após o tratamento com inibidor de WEE1 (MK-1775) e em combinação com inibidor de proteassoma (bortezomibe) utilizando citometria de fluxo e método de cultura em soft agar para formação de microesferas; - Avaliar a viabilidade celular após co-cultura com células estromais normais tratadas com inibidor de WEE1 e em combinação com inibidor de proteassoma.

-HIPÓTESE: A proteína WEE1 é um modulador negativo da entrada da célula na mitose e a superexpressão de WEE1 tem sido observada em várias neoplasias, como carcinoma hepatocelular, câncer de mama e glioblastoma. A inibição de WEE1 por siRNAs, ou pequenas moléculas inibidoras da expressão do gene, impulsiona a célula para a mitose precoce levando-a à apoptose, característica que tem sido explorada como estratégia terapêutica em outros tumores. Ensaios pré-clínicos têm mostrado diminuição da viabilidade celular e da carga tumoral e melhora na sobrevivência após inibição de WEE1. O inibidor MK-1775 inibe a WEE1 kinase e atua competindo com ATP, evitando o reparo do DNA. Com isso, nossos resultados sugerem a molécula WEE1 como possível alvo terapêutico que pode ser explorado no Mieloma Múltiplo.

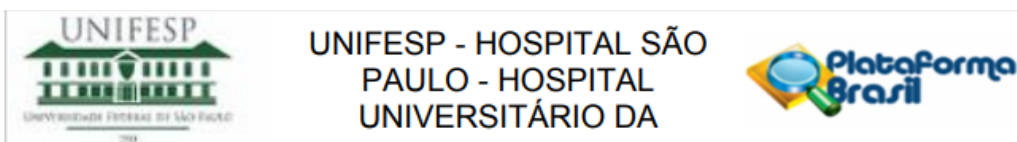
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara:

-RISCOS: Não se aplica;

-BENEFÍCIOS: Inibidor de WEE1 como possível alvo terapêutico que pode ser explorado no Mieloma Múltiplo.

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55	
Bairro: VILA CLEMENTINO	CEP: 04.020-050
UF: SP	Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062	Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.755.552

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de mestrado de REBECCA SILVEIRA SANTOS BARBOSA DANTAS. Orientadora: Profa. Dra. Gisele Wally Braga Colleoni. Projeto vinculado ao Departamento de Oncologia Clínica e Experimental, Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Campus São Paulo, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

TIPO DE ESTUDO: experimental

LOCAL: Departamento de Oncologia Clínica e Experimental, Disciplina de Hematologia e Hemoterapia,

PROCEDIMENTOS:

As linhagens celulares de MM serão submetidas à sorting por citometria de fluxo para identificar MM-CSCs (CD138-/CD19+/CD34+/ALDH1+) e à cultura em soft ágar para avaliar a formação de microesferas. A expressão de WEE1 será avaliada pela fórmula -2Ct. Após o tratamento com o inibidor de WEE1 (MK-1775), a análise de viabilidade celular será realizada através do teste funcional MTT. Após co-cultura e tratamento com inibidor de WEE1 a avaliação da apoptose será realizada através da Anexina V e PI. (mais informações, ver projeto detalhado).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente.
- 2- Propõe dispensa do TCLE. Justificativa: Não haverá inclusão de amostras de pacientes.

Recomendações:

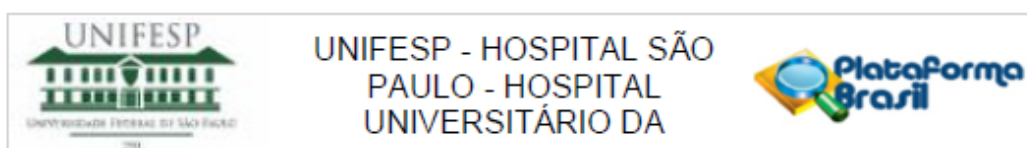
sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestralmente), e o relatório final, quando do término do estudo.



Continuação do Parecer: 2.755.552

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1163958.pdf	25/06/2018 11:52:07		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado_Rebecca_CORRIGIDO.pdf	25/06/2018 11:50:17	REBECCA SILVEIRA SANTOS BARBOSA DANTAS	Aceito
Outros	COMITE_DE_ETICA.docx	25/06/2018 11:36:30	REBECCA SILVEIRA SANTOS BARBOSA DANTAS	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_plataforma_Brasil.docx	25/06/2018 11:33:17	REBECCA SILVEIRA SANTOS BARBOSA DANTAS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Julho de 2018

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br

Anexo 3 – Artigo publicado (*Cancer Letters*)

[Biochem Biophys Res Commun.](#) 2019 Nov 12;519(3):597-604. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.163. Epub 2019 Sep 17.

Sequential combination of bortezomib and WEE1 inhibitor, MK-1775, induced apoptosis in multiple myeloma cell lines.

[Barbosa RSS¹](#), [Dantonio PM¹](#), [Guimarães T¹](#), [de Oliveira MB¹](#), [Fook Alves VL¹](#), [Sandes AF¹](#), [Fernando RC¹](#), [Colleoni GWB²](#).

[Author information](#)

Abstract

INTRODUCTION:

Multiple myeloma (MM) remains incurable due to high rates of relapse after various treatment regimens. WEE1 is a cell cycle related gene that regulates the G2/M checkpoint and promotes cell cycle suspension for consequent DNA repair. To date, there are clinical studies for the evaluation of WEE1 inhibitors in the treatment of solid tumors and studies on cell lines of non-MM hematological tumors.

OBJECTIVES:

To perform in vitro functional studies to verify the effect of the inhibition of WEE1 on MM cell lines viability and its potential as therapeutic target.

MATERIAL AND METHODS:

WEE1 expression was evaluated in 22 newly diagnosed MM patients and in four MM cell lines, RPMI-8226, U266 and SKO-007 and SK-MM2, by quantitative real-time PCR (qPCR). After treatment with the WEE1 inhibitor (MK-1775), with or without proteasome inhibitor (bortezomib) pretreatment, we assessed cell viability through Prestoblue functional test, microspheres formation in soft agar, and induction of apoptosis and cell cycle alterations by flow cytometry.

RESULTS:

All MM cell lines showed WEE1 expression by qPCR. RPMI-8226 and U266 showed a 50% reduction in cell viability after 24 h of incubation with MK-1775, at concentrations of 5 μ M and 20 μ M, respectively. SKO-007 showed dose and time dependence to this drug. Combination therapy with bortezomib and MK-1775 abolished the formation of soft agar microspheres in the RPMI-8226 cell line (also responsive to the use of both drugs) and U266, but SKO-007 was resistant to all drugs, isolated and combined. However, treatment of bortezomib followed by MK-1775 (sequential treatment) versus bortezomib alone showed statistically significant impact on cell lines total apoptosis: 88.8% vs 74.1% in RPMI-8222 (confirmed by cell cycle experiments); 92.5% vs 86.6% in U266; and 60.2% vs 30.9% on SKO-007 ($p < 0.05$).

CONCLUSION:

The sequential combination of bortezomib and WEE1 inhibitor, MK-1775, induced apoptosis in RPMI-8226, U266, and especially SKO-007 cell lines, more efficiently than the use of the same isolated drugs, highlighting its effect in inhibition of proliferation of tumor cells in MM cell lines. Our data suggest that WEE1 can figure as a MM target and that the sequential combination of bortezomib and MK-1775 may be explored in future clinical trials.

Copyright © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS:

MK-1775; Myeloma; WEE1

PMID: 31540690

DOI: [10.1016/j.bbrc.2019.08.163](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.163)

Anexo 4 – Currículo Lattes

Rebecca Silveira Santos Barbosa Dantas

Curriculum Lattes

Nome civil

Nome Rebecca Silveira Santos Barbosa Dantas

Dados pessoais

Nome em citações bibliográficas BARBOSA, R. S. S.

Sexo Feminino

Endereço eletrônico

E-mail para contato: rebecca.barbosa@unifesp.br

E-mail alternativo beccabarbosa@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

- 2018** Mestrado em Medicina - Hematologia.
Fundação de Apoio a Universidade Federal de São Paulo, FAPUNIFESP, São Paulo, Brasil
Título: Importância do Gene WEE1 e efeitos da sua inibição na sobrevida de células-tronco tumorais do mieloma múltiplo
Orientador: Gisele Wally Braga Colleoni
Palavras-chave: Mieloma Múltiplo, Células-tronco tumorais
- 2007 - 2010** Graduação em Biomedicina.
Universidade Bandeirante de São Paulo, UNIBAN, São Paulo, Brasil
Orientador: Luciana Pugliese
- 2004 - 2006** Ensino Médio (2o grau).
Escola Estadual Fazenda do Carmo III, E.E.F.C. III, Brasil
- 2011 - 2013** Aperfeiçoamento em Patologia Clínica.
Hospital das Clínicas HCFMUSP, HCFMUSP, Brasil
Título: ...AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE CRYPTOCOCCUS SPP EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRADIANO
Orientador: ...Adriana Lopes Mota
Bolsista do(a): Fundação de Desenvolvimento Administrativo
-

Atuação profissional

1. Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Biomédico
 , Carga horária: 40, Regime: Integral

Áreas de atuação

1. Biologia Geral

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **19º Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular**, 2018. (Congresso)
 Importância do Gene WEE1 e efeitos da sua inibição na sobrevivência de células-tronco tumorais do mieloma múltiplo.
2. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2018. (Congresso)
 IMPORTÂNCIA DO GENE WEE1 E EFEITOS DE SUA INIBIÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS DE MIELOMA MÚLTIPLO.
3. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **46º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica**, 2012. (Congresso)
 Estudo comparativo de resultados obtidos em amostras de soro e LCR através do teste ELISA (IgM e IgG) e Imunofluorescência para a detecção de Herpes vírus Tipo I e II.